

Untersuchung von kupferhaltigen Aminoxidasen aus Pyrrolizidin-Alkaloid-produzierenden Pflanzen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sabine Eleonore Denker
aus Wolfsburg

1. Referent: Professor Dr. Dietrich Ober
2. Referent: Professor Dr. Thomas Hartmann
eingereicht am: 11.02.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.06.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Denker, Sabine; Hartmann, Thomas; Ober, Dietrich.: Does a copper-containing amine oxidase catalyse the cyclisation of homospermidine in the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids? (Poster), Botanikertagung 2002, Freiburg i. Br., 22. -27. September 2002

Denker, Sabine; Ober, Dietrich.: Does a copper-containing amine oxidase catalyse the cyclisation of homospermidine in the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids (PartII)? (Poster), Botanikertagung 2004, Braunschweig, 05. -10. September 2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober danke ich für das spannende und interessante Thema und seine vielen Ideen und Anregungen. Seine ständige Bereitschaft zur Lösung von Problemen und seine intensive wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hartmann danke ich für seine Erfahrungen auf dem Gebiet der Pyrrolizidin-Alkaloide, die interessanten Diskussionen und sein Interesse an der Entwicklung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Till Beuerle für die Durchführung der GC-MS-Untersuchungen und seine Hilfe bei Interpretation der Spektren.

Herrn Dr. Robert Hänsch (Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig) und Frau Dr. Katharina Nowak für die intensive Betreuung bei der Signalpeptidsequenz-Analyse.

Frau Dr. Julia Kehr und Frau Dr. Regine Kleber am Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm für die Hilfe bei der LCM-Technik.

Herrn Dr. Manfred Nimtz an der Gesellschaft für Biologische Forschung (GBF) Braunschweig (jetzt Helmholtzzentrum für Infektionsforschung) für die ESI-MS/MS-Sequenzierungen von Proteinen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. U. Matern und Herrn Dr. Stefan Martens am Institut für Pharmazeutische Biologie, Marburg (Deutschland) für die zur Verfügungsstellung der „Pendelhubstichsägen-Methode“.

Herrn Dr. Florian Bittner, Botanisches Institut der TU Braunschweig, und der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Birgit Dräger, Institut für Pharmazeutische Biologie der MLU Halle, für die Bereitstellung von Hefektoren für das Hefeexpressionssystem.

Der japanischen Arbeitsgruppe von Dr. Katsuyuki Tanizawa (Institute of Scientific and Industrial Research der Universität, Osaka) für den Kontrollklon der bakteriellen Phenylethylaminoxidase.

Frau Nicole Wenzel für die Mithilfe bei der Etablierung eines Hefe-Expressionssystems und Frau Béatrice Busch für die Unterstützung bei den Signalpeptidsequenz-Analysen während ihrer sechsmonatigen Pharmaziepraktika.

Herrn Julian Lünig für die Hilfe bei der Etablierung einer Wurzelorgan-Klonkultur von *S. vernalis*.

Frau Doris Glindemann für die Umklonierung einer CAO-Sequenz.

Weiterhin danke ich allen früheren und jetzigen Mitarbeitern des Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig. Insbesondere danke ich Dr. Claudia Naumann und Sven Sehlmeier sowie vielen anderen, die zu dem angenehmen und freundlichen Arbeitsklima beigetragen haben.

Frau Dr. Stefanie Moll und Frau Elisabeth Kaltenegger für die Suche nach Tippfehlern.

Am Ende möchte ich mich noch bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Chemische Ökologie - Sekundärstoffwechsel	1
1.2. Pyrrolizidin-Alkaloide	2
1.3. Biosynthese von Pyrrolizidin-Alkaloiden	4
1.4. Polyamine und deren Bedeutung für die Pflanze	7
1.5. Kupferhaltige Aminoxygenasen (CAOs)	8
1.6. Problemstellung	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Chemikalien	15
2.2. Kits	15
2.3. Bakterienstämme - <i>E. coli</i>	15
2.4. Kulturführung von Bakterien	16
2.4.1. Kulturführung	16
2.4.2. Dauerkulturen	16
2.4.3. Medien	16
2.5. Hefestämme – <i>Pichia pastoris</i>	17
2.6. Kulturführung von <i>Pichia pastoris</i>	18
2.6.1. Kulturführung	18
2.6.2. Dauerkultur	18
2.6.3. Medien	18
2.7. Pflanzenmaterial	19
2.7.1. <i>Senecio vernalis</i> (Asteraceae)	19
2.7.1.1. Etablierung einer Klonkultur	19
2.7.1.2. Freiland und Kulturschrank	19
2.7.2. <i>Senecio jacobaeae</i> (Asteraceae)	20
2.7.3. <i>Eupatorium cannabinum</i> (Asteraceae)	20
2.7.3.1. Wurzelorgankultur	20
2.7.3.2. Freiland	20
2.7.4. <i>Pisum sativum</i> var. <i>medullare</i> (Fabaceae)	20
2.8. Steril-Kulturführung von Pflanzen	20
2.8.1. Lagerung von Pflanzenmaterial	20
2.8.2. Medien	20
2.9. Vektoren und Primer	21
2.9.1. Vektoren	21
2.9.2. Primer (Oligonucleotide)	22
2.9.2.1. Degenerierte Primer	22
2.9.2.2. Genspezifische Primer (GSP)	22
2.10. Molekularbiologische Methoden	23
2.10.1. Gesamt-RNA-Isolierung	23
2.10.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren	23
2.10.2.1. Gesamt-RNA und RNA-Reinheitsprüfung	23
2.10.2.2. Quantifizierung der DNA-Proben	24
2.10.3. Herstellung von cDNA	24
2.10.3.1. A - RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI-Fermentas)	24
2.10.3.2. B - SuperScript III - RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen)	24
2.10.3.3. C - Durascript - Enhanced Avian Reverse Transcriptase (Sigma)	24
2.10.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.10.4.1. Standard-PCR	25
2.10.4.2. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE-Technik)	27
2.10.4.3. Full-Length-PCR	28
2.10.4.4. „Long and Accurate“-PCR	28
2.10.4.5. RT-PCR (Reverse Transcription)	28
2.10.5. Agarosegelelektrophorese	29
2.10.6. Klonierung mit TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)	29
2.10.7. Restriktionen	30
2.10.8. Ligation	31

2.10.9.	Isolierung und Reinigung von DNA.....	31
2.10.9.1.	Gelreinigung und Säulenreinigung von DNA-Proben	31
2.10.9.2.	Mini-Präparationen von Plasmid-DNA	32
2.10.9.3.	Midi-Präparationen	32
2.10.9.4.	Mini-Präparationen von Plasmid-DNA (Handmethode)	32
2.10.10.	Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.10.11.	Transformation.....	33
2.10.12.	Identifikation von positiven Klonen	33
2.10.12.1.	Blau-Weiß-Screening	33
2.10.12.2.	Restriktionen der Plasmid-Extraktionen	34
2.10.12.3.	PCR-Screening	34
2.10.13.	DNA-Fällung mit Ethanol	35
2.10.14.	Sequenzierung und Sequenzauswertung.....	35
2.10.14.1.	Sequenzierung	35
2.10.14.2.	Sequenzauswertung	36
2.10.14.3.	ESI-MS/MS-Sequenzierung von Proteinen/Peptiden	37
2.10.15.	Site-Directed Mutagenesis	37
2.10.15.1.	pET28amod-Vektor.....	38
2.10.15.2.	pPICZB- und pPICZαA-Vektoren	38
2.10.16.	Hefe - <i>Pichia pastoris</i>	39
2.10.16.1.	Vorbereitung eines Plasmids zur Transformation in <i>P. pastoris</i>	39
2.10.16.2.	Kompetente Zellen und Transformation	39
2.10.16.3.	Identifikation von positiven Klonen	41
2.11.	Lokalisation von Proteinen über Signalpeptide	43
2.11.1.	Herstellung der cDNA-Konstrukte	43
2.11.2.	DNA-Beschichtung der Goldpartikel.....	44
2.11.3.	Partikelkanone	44
2.11.4.	Mikroskopische Analyse.....	45
2.12.	Proteinchemische Methoden	45
2.12.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.12.2.	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (native PAGE)	46
2.12.3.	Färbungen von SDS-PAGE-Gelen oder Blot-Membranen.....	47
2.12.3.1.	Coomassie-Blau-Färbung.....	47
2.12.3.2.	Indian Ink-Färbung.....	48
2.12.3.3.	Ponceau-Orange-Färbung	48
2.12.4.	Proteinbestimmung nach Bradford	48
2.12.5.	Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen	49
2.12.5.1.	Konzentrierung	49
2.12.5.2.	Umpuffern und Entsalzen von Lösungen mit PD10-Säulen	49
2.12.6.	Trichloressigsäure-Proteinfällung	50
2.12.7.	Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterialien	50
2.12.8.	Proteinrohextrakte aus <i>E. coli</i>	50
2.12.8.1.	Ultraschallbehandlung	50
2.12.8.2.	Lysozym-Aufschluss.....	51
2.12.8.3.	Kombinationsaufschluss bei Inclusion-bodies	51
2.12.9.	Affinitätsreinigung von Proteinen über Nickel-NTA-Agarose	51
2.12.9.1.	Native His-Tagreinigung	51
2.12.9.2.	Denaturierende His-Tag-Reinigung	52
2.12.9.3.	TALON®-Metallchelat-Affinitäts-Reinigung (BD Biosciences)	52
2.12.10.	<i>E. coli</i> -Expressionssystem.....	53
2.12.10.1.	Induktionsbedingungen	53
2.12.11.	Solubilisierung von Inclusion-bodies (IBs).....	54
2.12.11.1.	Solubilisierung von IBs mit Natriumglycinat	54
2.12.11.2.	Solubilisierung von IBs mit Harnstoff	55
2.12.12.	Renaturierung von IBs	55
2.12.12.1.	Dialyse.....	55
2.12.12.2.	<i>In vitro</i> -Refolding mit Chaperonen (Helferproteine).....	56
2.12.13.	Expressionssystem - <i>Pichia pastoris</i>	56
2.12.13.1.	Induktionsbedingungen für KM71H <i>Pichia pastoris</i> -Klone	56
2.12.13.2.	Schnelle Hefe-Protein-Präparation für SDS-PAGE.....	57
2.12.13.3.	Methoden zum Hefezellenaufschluss	57

2.12.14.	Western-Blot.....	59
2.12.14.1.	Extraktion des löslichen Gesamtproteins.....	60
2.12.14.2.	Blotten.....	60
2.12.14.3.	Immunodetektion.....	61
2.12.15.	Nachweis von Chinonproteinen durch Redox-Staining.....	62
2.13.	Gewebeeinbettung	62
2.13.1.	Technovit 7100 für die Lichtmikroskopie.....	62
2.13.1.1.	Fixierung	62
2.13.1.2.	Entwässerung	63
2.13.1.3.	Einbettung in Technovit 7100 (HeraeusKulzer).....	63
2.13.1.4.	Schneiden der Gewebelöckchen.....	63
2.13.1.5.	Immunomarkierung – Fluoreszenzmarkierung.....	63
2.13.2.	Paraplast® X-tra für Laser-Capture-Microdissection	64
2.13.2.1.	Fixierung	64
2.13.2.2.	Entwässerung	64
2.13.2.3.	Infiltration mit Paraplast.....	64
2.13.2.4.	RNA-Isolierung aus paraffineingebetteten Schnitten.....	65
	Entparaffinisierung und Zellysis-Methode (Handmethode)	65
	Gesamt-RNA-Extraktion nach RNeasy Plant Mini® Kit (QIAGEN).....	66
	Gesamt-RNA-Extraktion mit dem TRIZOL® Reagenz	66
	Prüfung auf RNA-Degradation.....	66
2.13.2.5.	Schneiden der Paraplast-Blöckchen.....	67
2.13.2.6.	Entparaffinisierung	67
2.14.	FastProteinLiquidChromatography (FPLC)	67
2.14.1.	Säulenmaterialien.....	68
2.14.1.1.	Phenylsepharose® CL-4B – hydrophobe Chromatographie.....	68
2.14.1.2.	DEAE-Fractogel-Säule - Ionenaustauschchromatographie	68
2.14.1.3.	Hydroxylapatit	68
2.14.2.	Batch-Test - Vorversuche	68
2.14.3.	FPLC - Chromatographie Bedingungen	69
2.14.3.1.	Puffersysteme	69
2.14.3.2.	Reinigung	69
2.15.	Assay – Aktivitätstest	70
2.15.1.	Substrate	70
2.15.2.	Herstellung von Homospermidin	70
2.15.3.	Herstellung von [¹⁴ C] 1-Pyrrolin	72
2.15.4.	Aktivitätsfärbung in nativen PAGE-Gelen	72
2.15.5.	Photometrische Assays.....	72
2.15.5.1.	ABTS-Methode	72
2.15.5.2.	Wasserstoffperoxid-Titan-Komplex-Methode	73
2.15.5.3.	Eisen-Xylenol-Orange-Komplex	73
2.15.6.	Inkubationsansätze für Radioassay	74
2.15.6.1.	Pflanzenrohextrakte.....	74
2.15.6.2.	<i>Pichia pastoris</i> -Proben (siehe 2.12.13):.....	74
2.15.6.3.	<i>E. coli</i> -Proben (siehe 2.12.10):.....	75
2.15.6.4.	Dialyse-Proben mit erhöhter Luftzufuhr (siehe 2.12.12)	75
2.15.7.	Positivkontrollen.....	75
2.15.7.1.	Erbsenrohextrakte	75
2.15.7.2.	Rinderplasma-Aminoxidase.....	76
2.16.	Methoden zur Analyse von Substanzen aus Inkubationsansätzen	76
2.16.1.	Dünnschichtchromatographie (DC)	76
2.16.1.1.	Fließmittel	76
2.16.1.2.	Detektion	76
	RITA-System (Rapid Intelligence TLC Analyser, Raytest)	76
	Sprühreagenzien	77
	Ninhydrin-Reagenz zum Nachweis von Aminosäuren, Aminen und Aminoazuckern.....	77
2.16.2.	Bestimmung von Polyaminen mit der HPLC.....	77
2.16.3.	GC-MS-Messung.....	78
2.16.3.1.	Derivatisierung mit MCF	78
2.16.3.2.	Derivatisierung mit MSTFA.....	78
2.16.3.3.	Reinigung von Substanzen aus Inkubationsansätzen durch DC-Trennung	79
2.16.4.	Flüssigszintillationsmessung.....	79

3. Ergebnisse	80
3.1. Vergleichende Untersuchung einer CAO	80
3.1.1. CAO aus <i>Pisum sativum</i> (PSAO)	80
3.1.1.1. Das bakterielle Expressionssystem	80
3.1.1.2. Etablierung des Expressionssystems <i>Pichia pastoris</i> am Beispiel der PSAO aus <i>Pisum sativum</i>	83
3.1.2. Tierische Aminoxygenasen	87
3.1.2.1. Inkubation der BPAO mit [¹⁴ C]Homospermidin	88
3.1.2.2. Inkubation der BPAO mit [¹⁴ C]Spermidin	90
3.1.2.3. Inkubation der BPAO mit [¹⁴ C]Putrescin	91
3.1.2.4. Zusammenfassung der Inkubationen mit der BPAO	91
3.2. Charakterisierung von CAO-Aktivitäten in verschiedenen Pflanzen	91
3.2.1. PSAO aus <i>Pisum sativum</i> -Rohextrakten	91
3.2.1.1. Inkubation von Erbsenrohextrakten mit [¹⁴ C]Putrescin	92
3.2.1.2. Inkubation von Erbsenrohextrakten mit [¹⁴ C]Spermidin	93
3.2.1.3. Inkubation von Erbsenrohextrakten mit [¹⁴ C]Homospermidin	94
3.2.1.4. Zusammenfassung - Inkubation von Erbsenrohextrakten	95
3.2.2. CAOs aus <i>S. vernalis</i> - und <i>E. cannabinum</i> -Wurzelroh-extrakten	95
3.2.2.1. Wurzelrohextraktinkubationen von <i>E. cannabinum</i> und <i>S. vernalis</i> mit [¹⁴ C]Homospermidin	96
3.2.2.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>S. vernalis</i> - und <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktinkubationen mit [¹⁴ C]Homospermidin als Substrat	99
3.2.3. Identifizierung von Produkten	101
3.2.3.1. Sprühreagenzien	101
3.2.3.2. HPLC	102
3.2.4. GC-MS-Identifizierung von potentiellen Produkten der Rohextraktinkubationen	102
3.2.5. FPLC – Anreinigung von Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus <i>E. cannabinum</i> - und <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextrakten	104
3.2.5.1. FPLC-Reinigung durch eine Hydroxylapatit-, DEAE-Fractogel- und einer Phenylsepharose-Säule mit dem Puffer-B-Gradient-1	104
3.2.5.2. FPLC-Reinigung von Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextrakten durch eine Hydroxylapatit- und DEAE-Fractogel-Säule mit dem Puffer-B-Gradient-2	111
3.2.5.3. Nachweis von Chinonproteinen durch Redoxstaining	114
3.2.5.4. Zusammenfassung	115
3.2.6. Stabilität	115
3.2.6.1. <i>Pisum sativum</i> -Rohextrakte	115
3.2.6.2. <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextrakte	116
3.3. Identifizierung und Isolierung von CAOs-codierenden cDNAs aus <i>Senecio vernalis</i>	117
3.3.1. PCR mit degenerierten Primern	117
3.3.2. 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	119
3.3.3. Herstellung einer <i>S. vernalis</i> -Klonkultur	121
3.3.3.1. Klonkultur	121
3.3.3.2. PCR mit degenerierten Primern	121
3.3.3.3. 3' RACE-PCR Genfamilie 2	122
3.3.3.4. 5'RACE (Klonkultur) für Genfamilie 1 und 2	123
3.3.3.5. 3'RACE-PCR Genfamilie 1	124
3.3.3.6. Stoppcodon-Analyse bei Genfamilie 1 und Leserahmenverschiebung der Genfamilie 2	125
3.3.3.7. Genfamilie 3 – PCR mit degenerierten Primern	128
3.3.3.8. 3'RACE – Genfamilie 3	128
3.3.3.9. 5'RACE – Genfamilie 3	129
3.3.3.10. Zusammenfassung der aus <i>S. vernalis</i> identifizierten Sequenzen	134
3.4. Identifizierung und Isolierung von CAO- codierender cDNAs aus <i>E. cannabinum</i>	135
3.4.1. PCR mit degenerierten Primern	135
3.4.2. 3'RACE PCR – Genfamilie 1 und 2	135
3.4.3. 5'RACE-PCR – Genfamilie 1	136
3.4.4. Zusammenfassung der aus <i>E. cannabinum</i> identifizierten Sequenzen	137

3.5.	Eigenschaften der identifizierten CAO-homologen Sequenzen aus <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i>	137
3.6.	Gewebespezifische Expression der drei CAO-homologen Sequenzen aus <i>Senecio vernalis</i>	139
3.6.1.	Vorversuche mit Sterilpflanzen der Klonkultur und Wildpflanzen	140
3.6.2.	Lokalisation der Transkription bei Wildpflanzen	141
3.7.	Expression von CAO-homologen cDNAs aus <i>Senecio vernalis</i>	144
3.7.1.	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> mit pET28amod-Vektor	144
3.7.1.1.	pET28mod-Vektor – "Site-Directed Mutagenesis"	144
3.7.1.2.	Heterologe Expression der SVAO1 aus <i>S. vernalis</i> mit und ohne Signalpeptidsequenz	145
3.7.1.3.	Heterologe Expression der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2) aus <i>S. vernalis</i>	147
3.7.2.	Coexpression mit Chaperonen	148
3.7.2.1.	Umklonierung der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os) zum Austausch der Resistenzkassette	149
3.7.2.2.	Coexpression der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os)	149
3.7.2.3.	Coexpression der SVAO2 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO2os)	151
3.7.3.	Renaturierung der SVAO aus Inclusion-bodies (IBs)	152
3.7.3.1.	Renaturierung der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1)	152
3.7.3.2.	Renaturierung der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2)	154
3.7.3.3.	Renaturierung der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os)	155
3.7.4.	Heterologe Expression der SVAO1 und SVAO2 aus <i>S. vernalis</i> in <i>P. pastoris</i>	160
3.7.4.1.	Heterologe Expression der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz in <i>P. pastoris</i> (SVAO1)	160
	Klonierung der SVAO1	160
	Expression der SVAO1	161
3.7.4.2.	Klonierung der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz in <i>P. pastoris</i> (SVAO2)	163
3.8.	Etablierung eines Assays für die CAO	164
3.8.1.	Photometrie	164
3.8.2.	Radioaktives Assay	165
3.8.2.1.	Identifizierung von Reaktionsprodukten in Reaktionsansätzen nach einer Inkubation durch Dünnschichtchromatographie	165
3.8.2.2.	Abbau von Polyaminen während Inkubationen durch Chaperone	166
3.8.2.3.	Etablierung eines Radio-Assays für CAOs	166
3.8.2.4.	Positivkontrollassay - Erbsenrohextrakte	166
3.8.2.5.	Positivkontrollassay - tierische Aminoxygenasen	167
3.8.2.6.	Inkubationen mit Wurzelorgankulturohextrakten von <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i> mit [¹⁴ C]Homospermidin als Substrat	168
3.8.2.7.	Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 mit und ohne Signalpeptidsequenz nach Expression in <i>E. coli</i> -Zellen und der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz nach Expression in <i>P. pastoris</i> -Zellen	168
3.8.2.8.	Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os) nach Expression in <i>E. coli</i> -Zellen und Renaturierung durch Dialyse	169
3.9.	Herstellung von potentiellen Substraten und Produkten für das CAO-Assay	170
3.9.1.	1-Pyrrolin	170
3.9.2.	Homospermidin	170
3.10.	Detektion von Chinonproteinen	171
3.10.1.	Nachweis von Chinonproteinen nach dem Blotten	171
3.10.2.	Aktivitätsfärbung im nativen Gel	171
3.11.	Signalpeptid-Analyse	172
3.12.	Weitere Strategien zur Identifizierung von Enzymen der PA-Biosynthese	175
3.12.1.	Untersuchung der HSS-Expression in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium	175
3.12.2.	Variationen der Gewebeeinbettungen für Laser-Capture-Microscopy (LCM)	177
3.12.2.1.	Wahl des <i>S. vernalis</i> -Pflanzenmaterials	177
3.12.2.2.	Paraffin-Einbettung	178
3.12.2.3.	RNA-Isolierung	179

4.	Diskussion.....	181
4.1.	Biosynthesewege	181
4.2.	Gewebespezifische Expression der drei SVAO-Sequenzen.....	185
4.3.	Analyse und Vergleich der Aminosäuresequenz der SVAO und der ECAO	189
4.4.	Expressionsbedingungen	194
4.5.	Aktivitätsmessung	196
5.	Ausblick	202
6.	Zusammenfassung	203
7.	Literaturverzeichnis	206

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modifizierte Einteilung der Pyrrolizidin-Alkaloide - Strukturtypen und Vorkommen.....	3
Abbildung 2: Postulierter Biosyntheseweg für die Bildung der Pyrrolizidin-Alkaloide in <i>Senecio</i> -Arten.....	6
Abbildung 3: Beispiele einiger in Pflanzen vorkommender Polyamine.....	8
Abbildung 4: Strukturen der Cofaktoren im aktiven Zentrum von CAOs.....	9
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Biogenese des TPQs im aktiven Zentrum von CAOs.....	9
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der reduktiven und oxidativen Halbreaktion im aktiven Zentrum von CAOs.....	10
Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der reduktiven und oxidativen Halbreaktion im aktiven Zentrum von CAOs.....	12
Abbildung 8: Partikelkanone.....	44
Abbildung 9: Schaukelvektoren pPICZB und pPICZαA zur Expression von heterologen Proteinen in <i>Pichia pastoris</i>	84
Abbildung 10: Nucleotid- und Aminosäuresequenz der PSAO von <i>Pisum sativum</i>	85
Abbildung 11: Reaktion einer Rinderplasma-Aminoxidase (BPAO) mit Homospermidin.....	87
Abbildung 12: Mögliche Reaktionen einer Rinderserum-Aminoxidase mit Spermidin.....	88
Abbildung 13: Chromatogramm einer BPAO-Inkubation mit [¹⁴ C]Homospermidin.....	88
Abbildung 14: Chromatogramm einer BPAO-Inkubation mit [¹⁴ C]Spermidin.....	90
Abbildung 15: Funktion pflanzlicher CAOs im Primärstoffwechsel.....	91
Abbildung 16: Chromatogramm einer Inkubation eines Erbsenrohextraktes mit [¹⁴ C]Putrescin.....	92
Abbildung 17: Spermidin-Oxidation durch eine PAO.....	93
Abbildung 18: Reaktion einer PAO mit Homospermidin.....	94
Abbildung 19: Chromatogramm einer Inkubation eines <i>Pisum sativum</i> -Rohextraktes mit [¹⁴ C]Hspd.....	94
Abbildung 20: Möglicher Biosyntheseweg des Necinbase-Grundkörpers der PAs.....	96
Abbildung 21: Strukturen des oxidierten Homospermidins bei verschiedenen pH-Werten.....	97
Abbildung 22: Dünnschichtchromatogramme von Inkubationen mit Wurzelrohextrakten von <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i> mit [¹⁴ C]Hspd.....	100
Abbildung 23: Chromatogramm einer Inkubation, der mit einer 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule angereinigten Homospermidin-umsetzenden Enzyme in Fraktion 6 eines <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextraktes mit Puffer-B-Gradient-1.....	105
Abbildung 24: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule.....	105
Abbildung 25: Prozentualer Anteil an Homospermidin und drei Produkten in den Fraktionen 6-10 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule.....	106
Abbildung 26: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-Hydroxylapatit-Säule.....	107
Abbildung 27: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten in den Fraktionen 5-8 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule.....	107
Abbildung 28: Chromatogramm einer Inkubation, der mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule angereinigten Homospermidin-umsetzenden Enzyme aus Fraktion 7 eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit einer mit Puffer-B-Gradient-1.....	108
Abbildung 29: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-Hydroxylapatit-Fractogel-Säule.....	109

Abbildung 30: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten in den Fraktionen 5-16 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule.	109
Abbildung 31: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule	110
Abbildung 32: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten in den Fraktionen 6-11 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-DEAE-Säule	111
Abbildung 33: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 über eine 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule	112
Abbildung 34: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten in den Fraktionen 10-25 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 mit einer 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule	112
Abbildung 35: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 über eine 1-ml-Hydroxylapatit-Säule	113
Abbildung 36: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten in den Fraktionen 5-15 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule	113
Abbildung 37: Alignment aus CAO-Sequenzen von <i>Pisum sativum</i> (PSAO), <i>Lens culinaris</i> (LSAO) und <i>Arabidopsis thaliana</i> (at1g31670 und at1g14940).....	118
Abbildung 38: Teilausschnitt der SVAO1-Sequenz aus <i>S. vernalis</i> (cDNA1 – Genfamilie 1) - nach dem Zusammensetzen der Teilsequenzen 5sv1-kw16sab3, 5sv-kw10gesamt und 3sv1-kw3	126
Abbildung 39: Teilausschnitt der SVAO2-Sequenz aus <i>S. vernalis</i> (cDNA2 – Genfamilie 2) - nach dem Zusammensetzen der Teilsequenzen klon6gesamt, deg-6-sv-kw und 3sv2-kw5	127
Abbildung 40: Nukleinsäuresequenz-Alignment aus der 5'RACE-Sequenz 5sv3-kb10gesamt mit dem Mittelteil degsv-kb3gesamt	133
Abbildung 41: Aminosäuresequenz-Alignment von SVAO1, SVAO2, SVAO3 (<i>S. vernalis</i>) und ECAO1 (<i>E. cannabinum</i>).....	139
Abbildung 42: RT-PCR von verschiedenen Geweben aus einer <i>S. vernalis</i> -Wildpflanze	143
Abbildung 43: Coexpression mit Chaperonen (Plasmid pRDKJG) von SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>) in <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Zellen.....	150
Abbildung 44: Solubilisierung von Inclusion-bodies der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1, cDNA1 aus <i>S. vernalis</i>).....	153
Abbildung 45: Solubilisierung von Inclusion-bodies der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2, cDNA2 von <i>S. vernalis</i>).....	154
Abbildung 46: Solubilisierung von Inclusion-bodies der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os -cDNA1 von <i>S. vernalis</i>)	155
Abbildung 47: Native His-Tag-Reinigung von solubilierten Inclusion-bodies der SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>)	156
Abbildung 48: Chromatogramm der SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>) mit Putrescin als Substrat.....	158
Abbildung 49: Möglicher Reaktionsablaufs (Produkte) einer SVAO1os-Inkubation (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>) mit Putrescin als Substrat.....	159
Abbildung 50: Vergleich einer Nickel-NTA-Agarose-Reinigung (Qiagen) mit der Talon®-Material-Reinigung (Clontech) eines French®Press-Aufschlusses	163
Abbildung 51: Grundkörper verschiedener Necinbasen.	165

Abbildung 52: Signalpeptidanalyse von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 (cDNA1, cDNA2 und cDNA3 aus <i>S. vernalis</i>) mit Hilfe von transformierten <i>N. tabacum</i> - und <i>S. vernalis</i> -Blättern.....	174
Abbildung 53: HSS-Expression von <i>S. vernalis</i> -Pflanzen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Topfpflanze in Fensterbank gezogen).....	175
Abbildung 54: HSS-Expression von <i>E. cannabinum</i> -Pflanzen (Gartenbeet) zu verschiedenen Zeitpunkten im Jahr.....	176
Abbildung 55: Immunolokalisation der HSS in Wurzelquerschnitten von <i>S. vernalis</i> ..	178
Abbildung 56: Vereinfachte Darstellung der Reaktionen des Primärstoffwechsels und des Sekundärstoffwechsels in <i>S. vernalis</i> , die an der PA-Biosynthese beteiligt sind, und mögliche Lokalisation der SVAOs ..	184
Abbildung 57: Aminosäuresequenz-Alignment von CAOs ..	190
Abbildung 58: Phylogenetische Analyse von CAO-Sequenzen ..	192

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Legende zur Abbildung 2.....	5
Tabelle 2: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	15
Tabelle 3: Verwendete <i>Pichia pastoris</i> -Stämme.	17
Tabelle 4: Verwendete Schaukelvektoren für <i>E. coli</i> - und <i>P. pastoris</i> -Zellen.	21
Tabelle 5: Verwendete Vektoren für <i>E. coli</i> -Zellen.	22
Tabelle 6: Oligo-dT-Primer für cDNA-Herstellung.....	24
Tabelle 7: Oligopeptide für RACE-PCR.	27
Tabelle 8: Verwendete Sequenzierprimer.	35
Tabelle 9: Proteasehemmer-Cocktail nach Schultz.....	59
Tabelle 10: Genspezifische Expressionsprimer für die Expression der PSAO (<i>Pisum sativum</i>) in <i>E. coli</i>	81
Tabelle 11: Genspezifische Expressionsprimer für die PSAO von <i>Pisum sativum</i> in <i>Pichia pastoris</i>	86
Tabelle 12: Inkubation einer BPAO mit [¹⁴ C]Homospermidin bei 30°C.....	89
Tabelle 13: Inkubation der BPAO mit [¹⁴ C]Homospermidin bei 22,5°C	89
Tabelle 14: Drei BPAO-Inkubationen mit [¹⁴ C]Spermidin nach Lee und Sayre	90
Tabelle 15: R _F -Werte sowie prozentuale Verteilung von entstandenen Peaks bei Inkubationen mit Erbsenrohextrakten mit [¹⁴ C]Putrescin	92
Tabelle 16: Inkubation von umgepufferten Erbsenrohextrakten mit [¹⁴ C]Spermidin	93
Tabelle 17: R _F -Werte der entstandenen Peaks einer <i>Pisum sativum</i> -Rohextraktinkubation mit [¹⁴ C]Homospermidin.....	95
Tabelle 18: Inkubationen von <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextrakten mit [¹⁴ C]Homospermidin als Substrat bei verschiedenen pH-Werten	97
Tabelle 19: Inkubationen mit <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextrakten mit [¹⁴ C]Hspd	98
Tabelle 20: Einfluss von verschiedenen Zusätzen auf Inkubationen von <i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextrakten mit [¹⁴ C]Hspd	98
Tabelle 21: Einfluss von verschiedenen Zusätzen auf Inkubationen von <i>S. vernalis</i> -Wurzelrohextrakten mit [¹⁴ C]Hspd	99
Tabelle 22: Zusammenfassung - Vergleich der entstandenen Produkt-Peaks (R _F -Werte) von Inkubationen mit Wurzelrohextrakten von <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i> mit [¹⁴ C]Hspd	101
Tabelle 23: Retentionszeiten (R _T -Werte) von benzoilierten Polyaminstandards bei der HPLC-Bestimmung	102
Tabelle 24: Anteil an extrahierbarer Aktivität in Prozent - Effizienz der Derivatisierung von vier verschiedenen Methoden.....	103
Tabelle 25: Degenerierte Primer für <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i> dargestellt.....	117
Tabelle 26: Verwendete Primerkombinationen bei der PCR mit degenerierten Primern	119
Tabelle 27: Genspezifischer Primer 1 für eine 3'RACE der CAO-homologen Sequenz aus <i>S. vernalis</i>	119
Tabelle 28: Genspezifischer Primer 2 für eine 3'RACE der CAO-homologen Sequenz aus <i>S. vernalis</i> passend zur internen Sequenz.....	120
Tabelle 29: Vergleich von Identitäten auf Nukleinsäureebene der identifizierten 3'-Enden	121
Tabelle 30: Genspezifische Primer für eine 5'RACE von cDNA1 und cDNA2 aus <i>S. vernalis</i>	123
Tabelle 31: Primer für Stoppcodon-Check von cDNA1 (SVAO1) und der Analyse der Leserahmenverschiebung von cDNA2 (SVAO2) aus <i>S. vernalis</i>	126
Tabelle 32: Genspezifischer Primer 3 für 3'RACE von cDNA3 aus <i>S. vernalis</i>	129
Tabelle 33: Genspezifische Primer für 5'RACE für cDNA3 aus <i>S. vernalis</i>	130
Tabelle 34: Genspezifische Primer zum Identifizieren der restlichen 500 bp am 5'-Ende von cDNA3 aus <i>S. vernalis</i>	131
Tabelle 35: Identifizierte CAO-homologe Sequenzen der Genfamilie 1 (cDNA1 – SVAO1), Genfamilie 2 (cDNA2 – SVAO2) und Genfamilie 3 (cDNA3 – SVAO3) aus <i>S. vernalis</i> ...	134
Tabelle 36: Genspezifische Primer 1 für 3'RACE der CAO-homologen Sequenz aus <i>E. cannabinum</i>	135

Tabelle 37: Genspezifische Primer für 5'RACE von cDNA1 aus <i>E. cannabinum</i>	136
Tabelle 38: Identifizierte CAO-homologe Sequenzen der Genfamilie 1 (cDNA1 – ECAO1) und Genfamilie 2 (cDNA2 – ECAO2) aus <i>E. cannabinum</i>	137
Tabelle 39: Zusammenfassung der Eigenschaften der CAO-homologen Sequenzen von <i>S. vernalis</i> und <i>E. cannabinum</i>	138
Tabelle 40: Genspezifische Primer für eine RT-PCR für die SVAO1 und SVAO2 aus <i>S. vernalis</i>	140
Tabelle 41: Transkriptionsorte der SVAO1 (mit und ohne Signalpeptidsequenz) und SVAO2 (mit Signalpeptidsequenz) nach RT-PCR	141
Tabelle 42: RT-PCR-Primer für SVAO1, SVAO2 und SVAO3 aus <i>S. vernalis</i>	142
Tabelle 43: Mutationsprimer zum Austausch der <i>NcoI</i> -Schnittstelle gegen eine <i>PstI</i> -Schnittstelle im pET-28a-Vektor durch „Site-Directed Mutagenesis“	145
Tabelle 44: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO1 mit und ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1 und SVAO1os - cDNA1 aus <i>S. vernalis</i>).....	145
Tabelle 45: Variation der IPTG-Konzentration bei der Induktion der SVAO1 (cDNA1 mit Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>) bei 25°C und 37°C für 4 h.....	146
Tabelle 46: Variation der IPTG-Konzentration bei den Induktionen der SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz von <i>S. vernalis</i>) bei 25°C und 37°C für 4 h.....	147
Tabelle 47: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2 - cDNA2 aus <i>S. vernalis</i>)	147
Tabelle 48: Variation der IPTG-Konzentration bei Induktionen der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2 - cDNA2 aus <i>S. vernalis</i>) bei 16°C, 25°C und 37°C für 4 Stunden und über Nacht (o/n)	148
Tabelle 49: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO2 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO2os-cDNA2 aus <i>S. vernalis</i>)	151
Tabelle 50: Einfluss des Chaperonzusatzes während der Dialyse zur Unterstützung der Faltung der solubilisierten Inclusion-bodies von SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>) sowie Einfluss des Hemmstoff HEH (1 mM) bei der Inkubation.....	159
Tabelle 51: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (cDNA1 aus <i>S. vernalis</i>) zur Expression in <i>Pichia pastoris</i>	160
Tabelle 52: Primer für die „Site-directed Mutagenesis“ mit den Hefevektoren pPICZB und pPICZαA zur Einführung einer <i>NdeI</i> -Schnittstelle zum Linearisieren	164
Tabelle 53: Dünnschichtchromatographisch gemessene R _F -Werte von Standards in drei verschiedenen Fließmitteln	165
Tabelle 54: R _F -Werte von erhaltenen Peaks nach Inkubation von Polyaminen mit Hsp70-Chaperonen	166
Tabelle 55: Genspezifische Primer für die Signalpeptidanalyse von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 (cDNA1, cDNA2 und cDNA3 aus <i>S. vernalis</i>).....	172
Tabelle 56: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO1 (cDNA1 mit Signalpeptidsequenz aus <i>S. vernalis</i>) und genspezifische Primer für die Homospermidinsynthese (HSS) von <i>S. vernalis</i>	180
Tabelle 57: Legende zur Abbildung 56	183
Tabelle 58: Verwendete CAO-Aminosäuresequenzen zum Erstellen des Aminosäuresequenz-Alignments und zur phylogenetischen Analyse	189
Tabelle 59: Vergleich von kupferhaltigen Aminoxidasen	191
Tabelle 60: Vergleich der Identitäten der vier identifizierten CAO-homologen Asteraceen-Sequenzen untereinander und mit einer CAO aus <i>Pisum sativum</i> (Fabaceae, PSAO), einer CAO des Rinderserums (Säugetier, BSAO) und einer CAO aus <i>Arthrobacter globiformis</i> (Bakterium, AGPAO) auf Aminosäureebene	193

Abkürzungsverzeichnis

≡	entspricht
~	ungefähr
∅	Durchmesser
AAP	Abridged-Anchor-Primer
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz)-thiazolinsulfonsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase
AGAO	Histaminoxidase von <i>Arthrobacter globiformis</i>
AGMAO	Methylaminoxidase von <i>Arthrobacter globiformis</i>
AGPAO	Phenylethylaminoxidase von <i>Arthrobacter globiformis</i>
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATAO1	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Aminoxidase
ATP	Adenosintriphosphat
AUAP	Abridged-Universal-Anchor-Primer
BJAO	<i>Brassica juncea</i> -Aminoxidase
bp	Basenpaar
BPAO	Rinderplasma-Aminoxidase
BSAO	Rinderserum-Aminoxidase
BSA	Rinderserumalbumin
CAAO	<i>Cicer arietinum</i> -Aminoxidase
Cad	Cadaverin
CAO	kupferhaltige Aminoxidase
cDNA	komplementäre DNA
CLAO	<i>Canavalia linelate</i> -Aminoxidase
cpm	counts per minute – Zählimpulse pro Minute
CTP	Cytosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DHS	Desoxyhypusin-Synthase
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotide
DOC	Desoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. cannabinum</i>	<i>Eupatorium cannabinum</i>
EC	<i>E. cannabinum</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAO	<i>Euphorbia characias</i> -Aminoxidase
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidierte Form)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Fließmittel
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatographie
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GCU	Gabaculin
GFP	Green-Fluorescent-Protein
GMAO	<i>Glycine max</i> -Aminoxidase
GSP	Genspezifischer Primer
HEH	β-Hydroxyethylhydrazin
HPAO	peroximale Aminoxidase von <i>Hansenula polymorpha</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hsp	Hitzeschockproteine
Hspd	Homospermidin
HSS	Homospermidinsynthase

IBs	Inclusion-bodies
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LCM	Laser-Capture-Microdissection
LSAO	<i>Lens culinaris</i> -Aminoxidase
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAO	Monoaminoxidase von <i>E. coli</i>
MCS	Multicloning-Site
MPO	<i>Nicotiana tabacum</i> -Aminoxidase
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MSOH	Murashige-Skoog-Medium
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NTB	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
os	ohne Signalpeptidsequenz
OSAO	<i>Oryza sativa</i> -Aminoxidase
PA	Pyrrolizidin-Alkaloide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDH	Pyrrolindehydrogenase
<i>Pfu</i> -Polymerase	<i>Pyrrococcus furiosus</i> -Polymerase
<i>Pfx</i> -Polymerase	recombinant DNA polymerase from <i>Thermococcus sp.</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSAO	<i>Pisum sativum</i> -Aminoxidase
Put	Putrescin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>R. viridis</i>	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
<i>S. jacobaea</i>	<i>Senecio jacobaea</i>
<i>S. vernalis</i>	<i>Senecio vernalis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLAO	<i>Solanum lycopersium</i> -Aminoxidase
Spd	Spermidin
Spm	Spermin
SV	<i>S. vernalis</i>
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TPQ	2,4,5-Trihydroxyphenylalainchinon
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumenprozent
VT	Volumenteile
WOK	Wurzelorgankultur
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Chemische Ökologie - Sekundärstoffwechsel

Der pflanzliche Stoffwechsel lässt sich in den Primär- und den Sekundärstoffwechsel unterteilen. Der Primärstoffwechsel umfasst alle Prozesse und Stoffe, die für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen unentbehrlich sind. Charakteristisch für ihn ist, dass er in allen Organismen fast gleich bzw. einheitlich ist und sich unter evolutionären Einflüssen wenig verändert hat [Hartmann, 1985]. Zusammenfassend lässt sich der Primärstoffwechsel als uniform, universell, unentbehrlich und konservativ beschreiben [Hartmann und Dierich, 1998]. Im Gegensatz dazu ist der Sekundärstoffwechsel nicht wichtig für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen. Die Funktion des Sekundärstoffwechsels war lange Zeit umstritten. Die Sekundärstoffwechselprodukte („Sekundären Pflanzenstoffe“) wurden 1893 „als Nebenprodukte des Stoffwechsels ohne Funktion bezeichnet, welche während des Stoffwechsels entstehen, aber keine weitere Verwendung für den Aufbau neuer Zellen finden. ... Irgendeine Bedeutung dieser Stoffe für die innere Ökonomie der Pflanze ist bis jetzt nicht bekannt.“ [Sachs, 1893]. Einige wenige Botaniker der Zeit sahen den Sekundärstoffwechsel als Schutz der Pflanzen gegen Herbivoren an und sprachen ihm eine Verteidigungsfunktion zu [Errera, 1886; Kerner von Marilaun, 1890]. Dennoch wurden die sekundären Pflanzenstoffe bis fast zur heutigen Zeit als Abfallprodukte, Nebenprodukte, Beiprodukte oder auch als Speicherprodukte des Pflanzenstoffwechsels angesehen [Mothes, 1955; Haslam, 1986; Luckner, 1990].

Heute wird dem Sekundärstoffwechsel eine ökologische Rolle bei der Interaktion der Pflanze mit ihrer Umgebung zugesprochen [Fritz und Simms, 1992; Harborne, 1993]. Er beschäftigt sich mit den Prozessen und Stoffen, die die Wechselbeziehungen des Individuums mit seiner Umwelt betreffen [Hartmann, 1985]. Er ist sehr unterschiedlich in den einzelnen Pflanzen, passt sich während der Evolution den äußeren Gegebenheiten an und ist ungeheuer wichtig für das Überleben der Population in ihrem Ökosystem. Zusammenfassend lässt sich der Sekundärstoffwechsel beschreiben als vielfältig, adaptiv und singulär. Die Interaktionen zwischen Pflanze und Umwelt sind weit gefächert: Abwehr von Pathogenen und Herbivoren, Schutz vor UV-Licht, Kälte sowie Verdunstung und Anlockung sowie Stimulation von Bestäubern und Samenverbreitern [Hartmann und Dierich, 1998; Pichersky und Gang, 2000]. Auch unterliegt der Sekundärstoffwechsel in der Regel keinem schnellen Abbau der Metaboliten und die beteiligten Enzyme besitzen eine geringe Aktivität mit hoher Substratspezifität. Viele Enzyme des Sekundärstoffwechsels sind durch Genduplikationen aus Genen entstanden, die im Primärstoffwechsel eine Rolle spielen. Sie variieren und intensivieren eine schon vorhandene Funktion oder sie ändern ihre Funktion während der Evolution [Frey et al., 2000; Ober und Hartmann, 2000; Pichersky und Gang, 2000; Gierl und Frey, 2001; Ober, 2005].

Eine Pflanze ist im Gegensatz zu den Tieren an den Standort fest gebunden. Ihre Abwehr ist passiv und erfolgt mechanisch z. B. durch Haare, Stacheln, Dornen oder sie erfolgt chemisch durch den

„Sekundärstoffwechsel“ [Hartmann, 1985]. Sekundäre Pflanzenstoffe schmecken oft bitter bzw. scharf oder sind toxisch. Sie werden häufig in spezialisierten Zellen oder Geweben gesammelt und die Freisetzung erfolgt bei der Zerstörung des Gewebes, wie z. B. bei der Pfefferminze (*Mentha x piperita*). Menthol wird bei der Zerstörung von Drüschuppen freigesetzt. Eine andere Möglichkeit ist die Induktion von Stoffen. Sie erfolgt, wenn Herbivoren oder Mikroorganismen die Pflanze beschädigen, wie z. B. bei der Bildung von Phytoalexinen [Bailey und Mansfield, 1981]. Andere Pflanzen bilden in großen Mengen protoxische Verbindungen. Die katalysierenden Enzyme und die protoxischen Verbindungen werden in verschiedenen Kompartimenten der Zellen akkumuliert. Erst durch Zerstörung der Zelle werden die Stoffe und Enzyme zusammengeführt und die toxischen Sekundärstoffe können sich bilden, z. B. die Allylsenföle des Meerrettichs (*Amoracia rusticana*) [Hartmann, 1985].

Einige Herbivoren haben es geschafft, die pflanzliche Verteidigung zu durchbrechen und die Stoffe für ihren eigenen Nutzen und Verteidigung zu verwenden. Eine Vielzahl von Verteidigungsstrategien sind bekannt [Hartmann, 1999]. Einige Insektenarten exkretieren die toxischen Substanzen effizient aus ihrem Körper oder inaktivieren sie durch Phase I und II Enzyme [Hartmann, 1985; Hartmann und Ober, 2000a; Ober, 2003]. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung der Stoffe als Ausgangsstoffe für Pheromone [Boppré, 1985; Schneider, 1987]. Auch werden Eier im Gelege durch sie geschützt, in dem das Weibchen die Gifte, die sie aus ihrer Nahrung und während der Paarung vom Männchen erhalten hat, auf die Eier überträgt [Dussourd et al., 1988; Conner et al., 1990; Dussourd et al., 1991]. Es können auch die Sekundärstoffe in speziellen Verteidigungsdrüsen angesammelt werden und bei einem Angriff durch ein anderes Insekt werden diese entleert [Pasteels, 1988].

Durch diese Interaktionen von Pflanze zu Insekt ist ein ständiger Selektionsdruck vorhanden, der eine ständige Veränderung von Pflanze als auch Insekt bewirkt. Dieses drückt sich durch eine große strukturelle Vielfalt der sekundären Pflanzenstoffe aus; etwa 200000 wurden identifiziert [Hartmann und Ober, 2003].

1.2. Pyrrolizidin-Alkaloide

Zu den Sekundärstoffwechselprodukten gehören auch die Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs). Diese Alkaloide sind nur in einigen wenigen Pflanzenfamilien der Angiospermen zu finden. Dazu zählen die Triben *Senecioneae* und *Eupatorieae* der Familie Asteraceae, viele Gattungen der Boraginaceae, die Gattung *Crotalaria* (Fabaceae), einige Orchideenarten (z. B. *Phalaenopsis*), einige Apocynaceen und einige Arten weiterer Pflanzenfamilien, wie die Convolvulaceae, Ranunculaceae, Rhizophoraceae, Santalaceae, Sapotaceae und Celastraceae. Es sind mehr als 400 Strukturen bekannt [Rizk, 1991; Hartmann und Witte, 1995; Pelser et al., 2005].

Die Pyrrolizidin-Alkaloide sind Esteralkaloide, die aus einer Necinbase und einer Necinsäure bestehen. Man unterscheidet offenkettige Mono- und Diester oder makrozyklisch Diester und sie

lassen sich in sechs Hauptgruppen einteilen (siehe Abbildung 1). Sie werden konstitutiv von den Pflanzen als Verteidigung gegen Herbivoren gebildet.

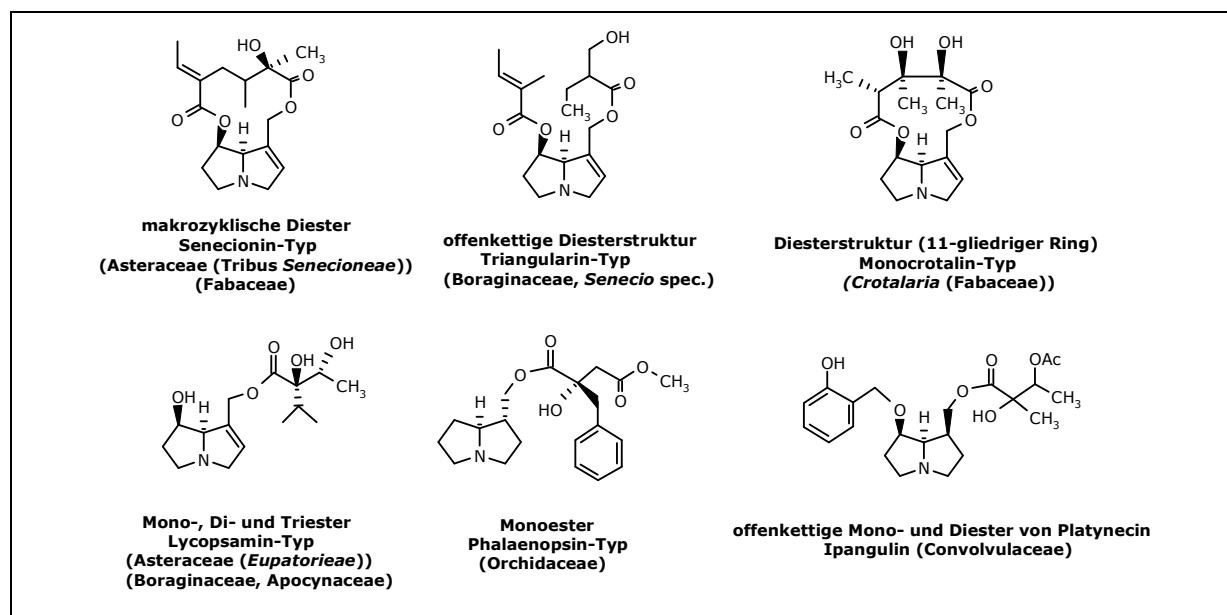


Abbildung 1: Modifizierte Einteilung der Pyrrolizidin-Alkaloide - Strukturtypen und Vorkommen.

Sehr genau sind die PA-haltigen Pflanzen der *Senecio*-Arten untersucht. Dort werden die Alkaloide in den Wurzeln synthetisiert. Senecionin-*N*-Oxid ist das erste Primärprodukt der PA-Biosynthese in diesen Pflanzen [Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann et al., 1988]. Während des Transports von den Wurzeln zum Spross durch das Phloem findet eine chemische Modifikation der Grundstruktur in das artenspezifische Alkaloidprofil statt. Kein Abbau ist nachzuweisen [Hartmann et al., 1989; Hartmann und Dierich, 1998]. Die Akkumulation der PAs erfolgt in den Vakuolen der Zellen, dabei ist ein spezifischer Carrier für die Aufnahme der PAs in die Vakuole verantwortlich [Ehmke et al., 1988]. Hauptspeicherorte für die Alkaloide sind die für das Überleben der Pflanze wichtigen Organe, die Knospe und die äußeren Gewebe der Blätter und des Stammes. Diese Gewebe würden durch Herbivoren als erstes angegriffen und die Knospe ist wichtig für die Fortpflanzung der Pflanze. Aber auch in allen anderen Pflanzenteilen sind die PAs vorhanden [Hartmann und Zimmer, 1986].

Bei *Heliotropium indicum* (Boraginaceae) findet die PA-Biosynthese im jungen Spross besonders in den jungen Blättern statt, bei *Symphytum officinale* (Boraginaceae) nur in den Wurzeln und bei *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae) in den Wurzeln und im Spross [Frölich et al., 2007]. Bei *Ipomoea hederifolia* (Convolvulaceae) ist der Biosyntheseort der Spross [Hartmann und Ober, 2000b]. Bei der Orchidaceae *Phalaenopsis* spec. erfolgt die Synthese in den Luftwurzeln [Frölich, 1996].

Es gibt zwei Formen der PAs: das *N*-Oxid (polar, salzähnlich, protoxisch) und die freie Base (lipophil, toxisch nach Bioaktivierung, passiert Biomembranen). Diese beiden Formen sind durch *N*-Oxidation bzw. Reduktion in einander umwandelbar [Hartmann und Ober, 2000a]. In der Pflanze liegt das PA als *N*-Oxid vor [Hartmann et al., 1989]. Einige Ausnahmen sind bekannt. Die Samen von *Crotalaria scassellatii* (Fabaceae) speichern PAs in Form des tertiären Amins [Toppel et al., 1988; Chang und

Hartmann, 1998]. Bei *Phalaenopsis spec.* liegt das tertiäre Amin neben dem *N*-Oxid vor [Frölich et al., 2006]. Nicht angepasste Herbivoren nehmen die Alkaloide mit der Nahrung auf und eine Reduktion zur tertiären Base findet im Darm statt. Diese können durch Permeation Membranen leicht passieren [Lindigkeit et al., 1997].

Pyrrolizidin-Alkaloide sind toxisch, wenn sie folgende Strukturmerkmale besitzen: eine 1,2-Doppelbindung, eine veresterte OH-Gruppe an Position C9 und eine freie oder veresterte OH-Gruppe an Position C7 [Winter und Segall, 1989]. Durch Bioaktivierung durch mikrosomale Cytochrom P-450 Monooxygenasen der Leber entstehen aus den tertiären Basen Dehydropyrrolizidine (Pyrrolester). Diese haben hepatoxische, kanzerogene und genotoxische Eigenschaften, da sie Vernetzungsreaktionen von DNA und Proteinen verursachen können [Mattocks, 1986; Fu et al., 2002; Fu et al., 2004]. Die polaren *N*-Oxide sind protoxisch, da sie durch das reduzierende Milieu des Darmes in die tertiäre Form überführt werden können.

Einige Herbivoren haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um die „chemische Abwehr“ der PA-Pflanzen zu umgehen und sie für ihre eigene Verteidigung zu nutzen. Ein Beispiel ist die Larve des Arctiiden *Tyria jacobaeae*, die ihre Nahrung fast ausschließlich von der PA-Pflanze *Senecio jacobaeae* aufnimmt. Eine NADPH-abhängige Flavin-Monooxygenase (Senecionin-*N*-Oxygenase, SNO) oxidiert die aus dem Darm aufgenommenen tertiären PAs in der Hämolymphe zum *N*-Oxid. In der Hämolymphe werden die PA-*N*-Oxide gespeichert und für die eigene Abwehr gegen Fraßfeinde verwendet [Lindigkeit et al., 1997].

1.3. Biosynthese von Pyrrolizidin-Alkaloiden

Mit Hilfe von Wurzelorgankulturen von *Senecio spec.* konnte die PA-Biosynthese leicht untersucht werden, da in diesen die Biosynthese vollständig abläuft [Toppel et al., 1987]. Hemmstoffexperimente und Isotopenfütterungsexperimente haben ergeben, dass die Ausgangsstoffe der Biosynthese Arginin und Ornithin sind (siehe Abbildung 2). Über Agmatin wird Putrescin gebildet [Robins und Sweeney, 1979; Hartmann et al., 1988]. Die Enzyme ① Arginin-Decarboxylase (EC 4.1.1.19), ② Agmatin-Iminohydrolase (EC 3.5.3.12) und ③ *N*-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase (EC 3.5.1.53) sind nachgewiesen und charakterisiert worden [Hartmann et al., 1988; Sander und Hartmann, 1989].

Spermidin wird in einer nicht β -Hydroxyethylhydrazin (HEH)-hemmbaren Reaktion ⑨ zu Putrescin abgebaut [Graser und Hartmann, 1997, 2000].

Homospermidin wird aus Putrescin und Spermidin in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion ❶ durch die Homospermidinsynthase (HSS) gebildet [Böttcher et al., 1993; Böttcher et al., 1994]. Retronecin wird aus Homospermidin gebildet [Khan und Robins, 1981b; Robins und Sweeney, 1981; Kunec und Robins, 1989]. Die Homospermidinsynthase ist das erste spezifische Enzym in der PA-Biosynthese, das den Primärstoffwechsel mit dem Sekundärstoffwechsel verknüpft. Homospermidin wird ohne Abbau in den Necinbase-Grundkörper eingebaut und ein Iminiumion als Intermediat konnte dabei nachgewiesen werden [Khan und Robins, 1981a; Kelly und Robins, 1988].

Im Primärstoffwechsel der Pflanzen wird Putrescin zu 1-Pyrrolin durch eine ④ kupferhaltige Aminoxydase CAO (EC 1.4.3.6) abgebaut (siehe 1.5) [Cona et al., 2006]. Im Gegensatz dazu wird das Polyamin Spermidin durch eine ⑩ FAD-enthaltene Polyaminoxidase PAO (EC 1.5.3.11) an der sekundären Aminogruppe oxidiert. Es entstehen 1,3-Diaminopropan und 1-Pyrrolin [Cona et al., 2006].

Fütterungsexperimente mit [¹⁴C]Putrescin und Wurzeln von *Senecio*- und *Eupatorium*-Arten haben ergeben, dass durch Zugabe des Polyaminoxidase- sowie kupferhaltige Aminoxydase-Hemmstoffes β -Hydroxyethylhydrazin (HEH) im Primärstoffwechsel der Pflanze kein 1-Pyrrolin gebildet wird. Auch wird der Schritt ❷ nach der Homospermidin-Synthese bei der PA-Biosynthese gehemmt, so dass Homospermidin angereichert wird [Böttcher et al., 1993].

Untersuchungen mit der „Diaminoxidase“ der Erbse (EC 1.4.3.6) unterstützen die Annahme, dass die Oxidation von Homospermidin durch eine CAO erfolgt. Es wurde die „Diaminoxidase“ mit Catalase und Homospermidin inkubiert [Khan und Robins, 1985]. Nach sechs Tagen Inkubation wurde eine Alkoholoxidase mit NADH und Ethanol zugefügt. Als Reaktionsprodukt wurde Trachelanthamidin erhalten [Khan und Robins, 1985].

Der weitere Reaktionsablauf der Necinbase-Grundkörpersynthese ist noch nicht genauer untersucht. Es wird spekuliert, dass nach der Oxidation des Homospermidins durch eine CAO zum Aldehyd eine Zyklisierung zum Iminiumion durch eine Mannich-Kondensation erfolgt [Khan und Robins, 1985]. Die Aldehydgruppe des 1-Formylpyrrolizidins wird anschließend zum Alkohol reduziert, so dass 1-Hydroxymethylpyrrolizidin entsteht. Die Reihenfolge dieser Schritte und auch die daran beteiligten Enzyme sind noch spekulativ [Kunec und Robins, 1989].

①	Arginin-Decarboxylase (EC 4.1.1.19)
②	Agmatin-Iminohydrolase (EC 3.5.3.12)
③	N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase (EC 3.5.1.53)
④	kupferhaltige Aminoxydase (EC 1.4.3.6) - Primärstoffwechselenzym, HEH-hemmbar Reaktion (CAO)
⑤	γ -Aminobutylaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.19)
⑥	γ -Aminobuttersäure-Transaminase (EC 2.6.1.19)
⑦	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.24)
⑧	Spermidin-Synthase (EC 2.5.1.16)
⑨	Putrescinproduzierendes Enzym, nicht HEH-hemmbar Reaktion
⑩	Polyaminoxidase (EC 1.5.3.11), HEH-hemmbar Reaktion (PAO)
❶	Homospermidinsynthase (EC 2.5.1.45), NAD ⁺ -abhängige Reaktion (HSS)
❷	möglicherweise eine kupferhaltige Aminoxydase (EC 1.4.3.6) - Sekundärstoffwechselenzym, HEH-hemmbar Reaktion (CAO)

Tabelle 1: Legende zur Abbildung 2 (nächste Seite)

①②③ [Hartmann et al., 1988] ⑧ ⑨ [Graser und Hartmann, 1997, 2000] ⑩ [Adolph, 1991] ❶ [Böttcher et al., 1993]

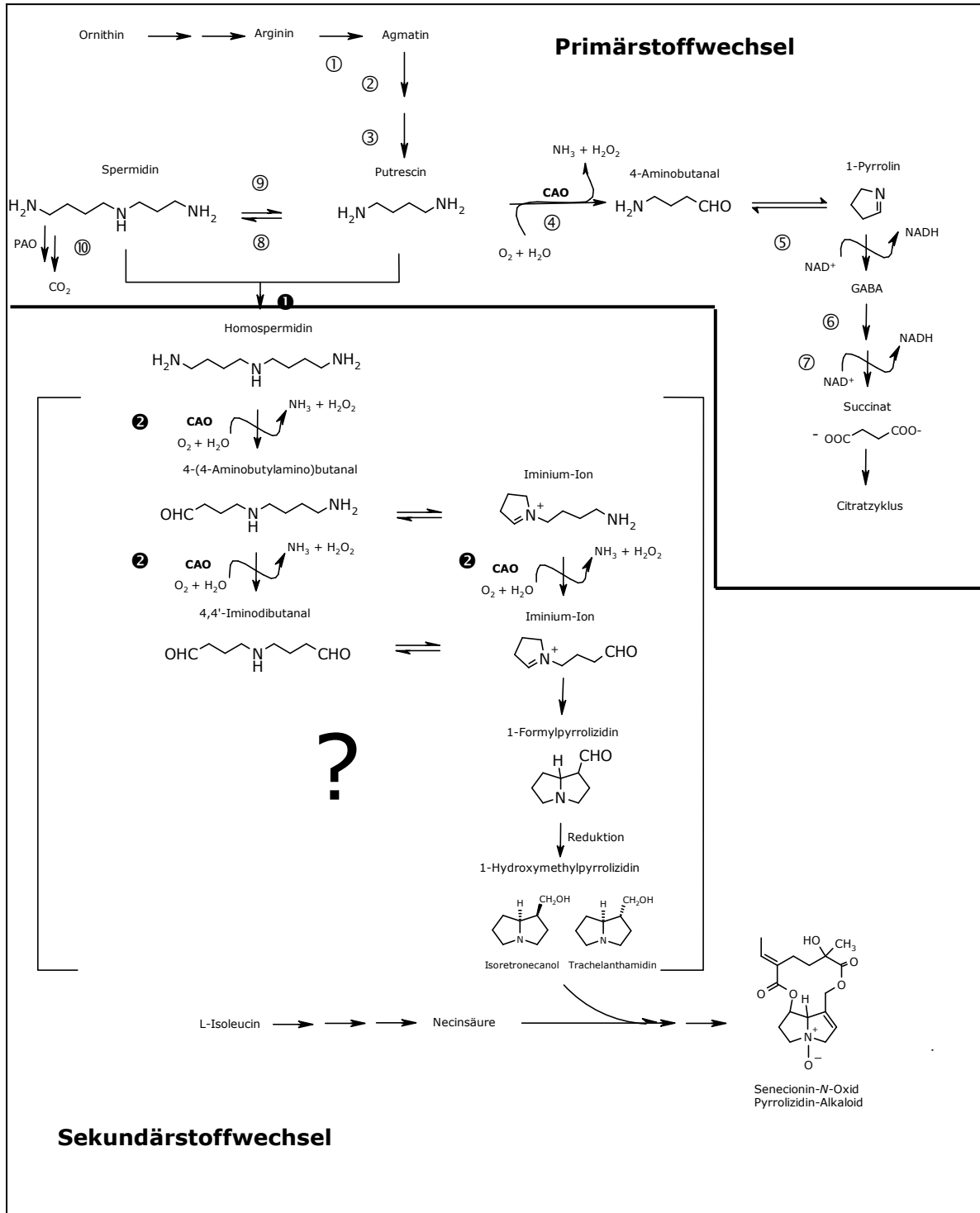


Abbildung 2: Postulierter Biosyntheseweg für die Bildung der Pyrrolizidin-Alkaloide in *Senecio*-Arten (Legende siehe Tabelle 1 - vorige Seite).

Im Sekundärstoffwechsel von *Hyoscyamus niger* (Solanaceae) wurde eine CAO-Aktivität bei der Bildung von Tropanalkaloiden nachgewiesen. *N*-Methylputrescin wird durch eine CAO an der

primären Aminogruppe zum 4-Methylaminobutanal oxidiert und anschließend erfolgt ein spontaner Ringschluss [Hashimoto et al., 1989a, b; Hashimoto et al., 1990; Hashimoto und Yamada, 1994].

Eine ähnliche Reaktion wird von einer CAO in den Wurzeln von *N. tabacum* (Solanaceae) katalysiert. Nach der Oxidation durch die *N*-Methylputrescin-Oxidase, einem Mitglied der Diaminoxidasefamilie, entsteht *N*-Methylpyrrolin, das durch Folgereaktionen zum Nicotin reagiert [Mizusaki et al., 1972; Walton und McLauchlan, 1990; McLauchlan et al., 1993; Hashimoto und Yamada, 1994]. In *Papaver somniferum* L. wurde eine CAO bei der Bildung von (*S*)-Reticulin während der Benzylochinolinalkaloidsynthese nachgewiesen [Podobová et al., 1994; Bilková et al., 2005].

Die Oxidation an einer primären Aminogruppe von Homospermidin zum Aminoaldehyd erfolgt auch durch die Rinderserum-Aminoxidase (BSAO), die zu der Familie der CAOs zählt [Lee und Sayre, 1998; Houen et al., 2005].

Neben dem Reaktionsmechanismus sind die evolutionären Zusammenhänge der PA-Biosynthese interessant. Die pflanzliche HSS (siehe oben) zeigt hohe Sequenzidentität zur Desoxyhypusinsynthese (DHS, EC 2.5.1.46), einem Enzym des Primärstoffwechsels. Die DHS katalysiert in einer NAD⁺-abhängigen Reaktion die Übertragung einer Aminobutyl-Einheit des Spermidins auf einen spezifischen Lysin-Rest eines eIF-5A-Vorläuferproteins. Als Nebenaktivität besitzt sie die Fähigkeit, Putrescin als Aminobutylrezeptor zu verwenden und Homospermidin zu bilden. Das Homospermidinsynthasegen ist mehrfach unabhängig voneinander aus einem Desoxyhypusinsynthese-(DHS)-Vorfahren durch Genduplikation während der Evolution der Angiospermen entstanden, einmal in den Boraginaceae, einmal in den Monocotylen und zweimal in den Asteraceen (*Senecioneae* und *Eupatorieae*). Die HSS hat die DHS-Funktion, den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF5A zu binden, während der Evolution verloren und besitzt nur noch die Funktion Homospermidin zu bilden [Ober und Hartmann, 1999a, b; Ober et al., 2003a; Ober et al., 2003b; Reimann et al., 2004]. Es sind einige weitere Beispiele für eine Funktionsänderung nach Genduplikation in der Natur bekannt [Hashimoto und Yamada, 1994; Hashimoto et al., 1998; Frey et al., 2000; Gierl und Frey, 2001]. Ähnliches könnte bei dem Enzym, das Homospermidin als Substrat in der PA-Biosynthese verwendet, stattgefunden haben. Aufgrund der zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Eigenschaften der Homospermidin-umsetzenden Reaktion liegt die Vermutung nahe, dass das Enzym durch Rekrutierung aus einem CAO-codierenden Gen entstanden ist oder eine CAO ihre Funktion variiert bzw. intensiviert hat.

1.4. Polyamine und deren Bedeutung für die Pflanze

In Pflanzen sind kleine aliphatische Amine ubiquitär vorhanden. Zu ihnen zählen die Diamine Putrescin, Cadaverin und die Polyamine Spermin, Spermidin sowie Homospermidin (siehe Abbildung 3).

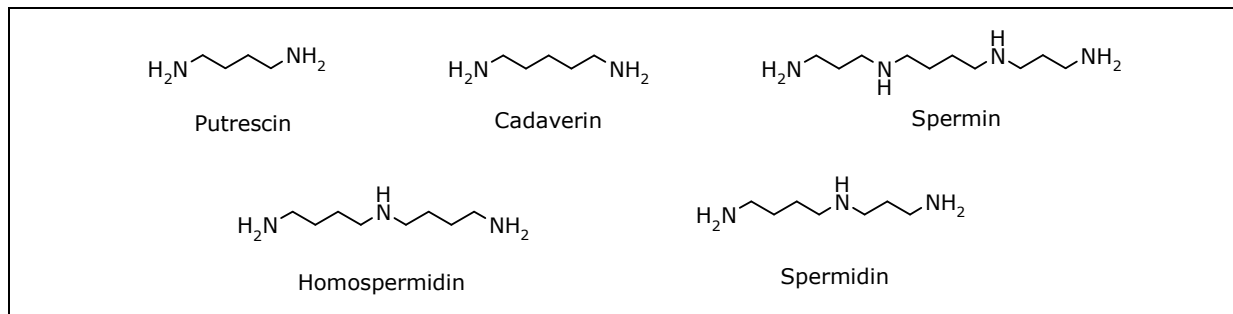


Abbildung 3: Beispiele einiger in Pflanzen vorkommender Polyamine.

Polyamine spielen eine Rolle in der Pflanzenentwicklung wie z. B. bei der Zellteilung, der Embryogenese, der Pflanzenalterung, der Wurzel-, der Blüten-, der Früchte- und der Pollenschlauchbildung [Slocum et al., 1984; Evans und Malmberg, 1989; Galston und Sawhney, 1990]. Bei physiologischen pH-Werten liegen Polyamine positiv geladen vor [Takeda et al., 1983]. Dadurch binden sie stark an die negativ geladenen Nukleinsäuren [Flink und Pettijohn, 1975], an die Phospholipide der Plasmamembranen und an viele Proteine [Srivastava und Smith, 1982] [Bouchereau et al., 1999]. Die Polyamine werden im Primärstoffwechsel der Pflanze als Stickstoffquelle genutzt [Smith, 1985].

Die Polyaminkonzentration und -biosynthese sind meist am höchsten, wenn die Zellteilungsrate am größten ist [Palavon und Galston, 1982]. Der Polyamingehalt von Pflanzen ist abhängig von Streßfaktoren, wie z. B. Pathogeninfektionen, hoher Salzgehalt, Hitze, Kälte, osmotischer Stress oder Sauerstoffmangel [Bouchereau et al., 1999; Walters, 2003].

Für eine oxidative Deaminierung der Polyamine sind kupferhaltige Aminoxidasen CAOs (EC 1.4.3.6) und Flavoproteine Polyaminoxidasen PAOs (EC 1.5.3.3) in Pflanzen verantwortlich. Neben dem Abbau von Polyaminen spielen kupferhaltige Aminoxidasen (siehe 1.5) durch ihre Reaktionsprodukte bei wichtigen physiologischen Prozessen eine Rolle [Cona et al., 2006].

1.5. Kupferhaltige Aminoxidasen (CAOs)

Kupferhaltige Aminoxidasen (CAO - EC 1.4.3.6) sind in der Natur ubiquitär vorhanden. In Pflanzen kommen sie in größerer Menge in Leguminosen vor, wie z. B. bei der Erbse, Linse und der Sojabohne [Klinman, 1996; Cona et al., 2006]. In Pflanzen sind CAOs für das Wachstum insbesondere für die Zellwandbildung durch Lignifizierung und für die Wundheilung wichtig [Fontecave und Eklund, 1995; Angelini et al., 1996; Moeller und McPherson, 1998; Rea et al., 1998; Paschalidis und Roubelakis-Angelakis, 2005]. Außerdem spielen sie bei der Pflanzenverteidigung eine Rolle [Moeller und McPherson, 1998; Rea et al., 1998; Rea et al., 2002]. Sie sind weiterhin bei der Bildung von Sekundärstoffen beteiligt, z. B. bei der Nicotin-, Benzylisochinolin- und Tropanalkaloidsynthese [Mizusaki et al., 1972; Hashimoto et al., 1986, 1989a, b; McLauchlan et al., 1993; Podobová et al., 1994; Bilková et al., 2005; Cona et al., 2006].

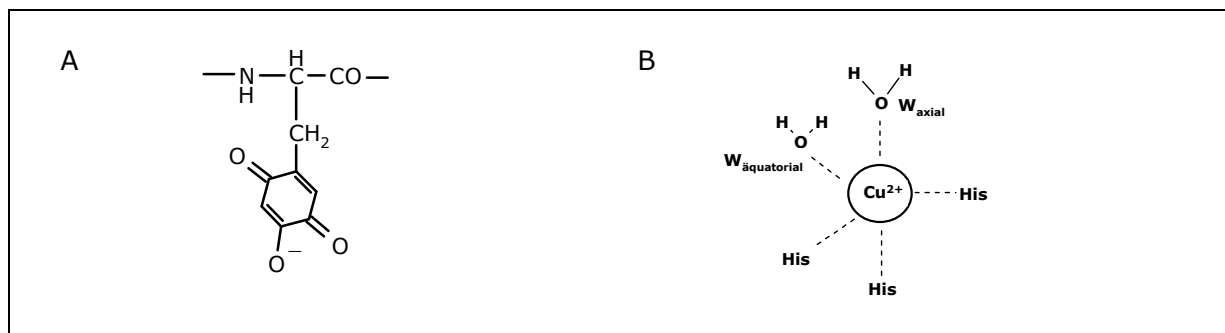


Abbildung 4: Strukturen der Cofaktoren im aktiven Zentrum von CAOs:

A: TPQ (2,4,5-Trihydroxyphenylalanin-chinon) in seiner oxidierten Form und B: Kupfer(II)-Ion

CAOs sind Homodimere. Eine Untereinheit ist von 70 bis zu 95 kDa groß [Medda et al., 1995a]. Jede Untereinheit enthält im aktiven Zentrum als Cofaktoren ein Kupferion und das kovalent gebundene 2,4,5-Trihydroxyphenylalaninchinon (TPQ) (siehe Abbildung 4 A). Eine offene Frage gibt es in Bezug auf die Anzahl der aktiven TPQs pro Dimer. Bei der CAO von *Lathyrus odoratus* bzw. *Lathyrus sativus* (Fabaceae) und der CAO von *Lens culinaris* (Fabaceae) wurden zwei gleichwertige aktive Zentren nachgewiesen. Bei der Aminoxydase der Hefe *Kluyveromyces marxianus* und bei einer Rinderserum-Aminoxydase wurde eine „Halbseitenreaktivität“ festgestellt [Janes und Klinman, 1991; de Biase et al., 1996; Sebela et al., 1998; Corpillo et al., 2003; Pietrangeli et al., 2003].

CAOs lassen sich durch Hemmstoffe inhibieren. Einige Hemmstoffe reagieren mit der Carbonylgruppe des TPQs im aktiven Zentrum unter Bildung einer kovalenten Bindung. Dabei tritt eine irreversible Hemmung ein, wie z. B. durch Hydrazinderivate. Eine reversible Hemmung erfolgt durch Kupferkomplexbildner (z. B. Cyanide, Azide, EDTA). Mechanismusbasierende Hemmstoffe nach Walsh [1984] reagieren mit Intermediaten des Redoxzykluses (siehe unten) oder mit Aminosäureresten des Enzyms. Dazu zählen u. a. Tryptamin und Tyramin [Padiglia et al., 1998; Padiglia et al., 2004; Longu et al., 2005a].

Das TPQ wird aus der Aminosäure Tyrosin durch eine posttranslationale Modifikation gebildet (siehe Abbildung 5) [Cai und Klinman, 1994a; Klinman und Mu, 1994; Matsuzaki et al., 1994; Choi et al., 1995; Choi et al., 1996; Klinman, 1996]. Dazu sind Kupfer(II)ionen und Sauerstoff notwendig [Kim et al., 2002; Brazeau et al., 2004; Prabhakar und Siegbahn, 2004; Okajima et al., 2005; Samuels und Klinman, 2005; Samuels und Klinman, 2006].

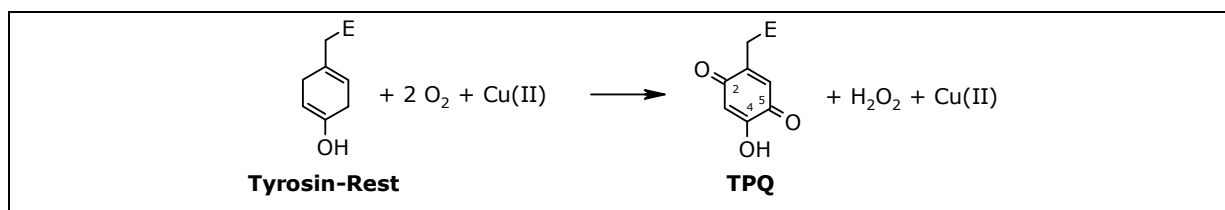


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Biogenese des TPQs im aktiven Zentrum von CAOs.

Die Struktur von CAOs einiger Organismen ist aufgeklärt worden [Parsons et al., 1995; Kumar et al., 1996; Wilce et al., 1997; Li et al., 1998; Chen et al., 2000; Lunelli et al., 2005], u. a. von der

pflanzlichen CAO von *Pisum sativum* [Kumar et al., 1996; Duff et al., 2006]. Im aktiven Zentrum des nativen Enzyms ist das Cu(II)-Ion quadratisch-pyramidal gebunden (siehe Abbildung 4 B). Drei äquatoriale Liganden werden durch drei konservierte Histidin-Reste (His) gebildet und außerdem ist ein axialer und ein äquatorialer Wasserligand (W) vorhanden.

CAOs katalysieren die oxidative Deaminierung von verschiedenen Di- und Polyaminen an der primären Aminogruppe mit Sauerstoff zu Aldehyden, Ammoniak und Wasserstoffperoxid [Cona et al., 2006]. Polyaminoxidasen (PAO) spalten Polyamine an der sekundären Aminogruppe mit Sauerstoff unter Wasserstoffperoxidbildung in einen Aldehyd und ein Amin [Cona et al., 2006]. Pflanzliche Aminoxidasen, insbesondere die Enzyme der Erbse, Linse und Knallerbse, verwenden als Substrate Putrescin, Cadaverin und Agmatin sowie die Polyamine Spermidin und Spermin [Medda et al., 1995a].

Die allgemein katalysierte Reaktion von CAOs folgt einem Ping-Pong Mechanismus und besteht aus einer reduktiven und einer oxidativen Halbreaktion (siehe Abbildung 6) [Mure et al., 2002]. Die reduktive Halbreaktion (1) ist sehr gut untersucht worden, während die oxidative Halbreaktion (2) noch einige Fragen offen lässt [Shepard und Dooley, 2006].

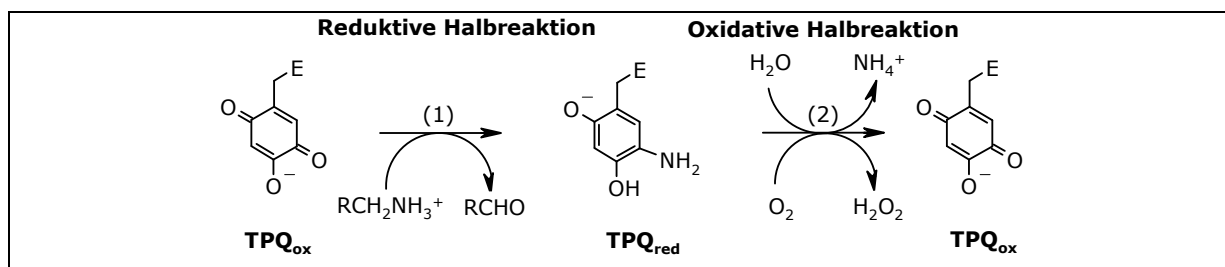


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der reduktiven und oxidativen Halbreaktion im aktiven Zentrum von CAOs.

In der reduktiven Halbreaktion wird das Substratamin ($\text{RCH}_2\text{NH}_3^+$) zum Produktaldehyd (RCHO), während das Enzym TPQ_{ox} durch zwei Elektronen zum TPQ_{red} reduziert wird. In der oxidativen Halbreaktion wird das reduzierte Enzym durch Sauerstoff zum TPQ_{ox} oxidiert und Ammoniak und Wasserstoffperoxid entstehen [Mure, 2004].

Die reduktive und oxidative Halbreaktion, die im aktiven Zentrum abläuft, ist detaillierter in Abbildung 7 dargestellt. In der reduktiven Halbreaktion greift das primäre Amins substrat nucleophil an dem C5 Carbonylsauerstoff des TPQ_{ox} an und bildet die Substrat-Schiffsche Base (TPQ_{SSB} – Cu(II)-Chinonketimin) [Wilce et al., 1997; Li et al., 1998]. Im Anschluss findet eine C α -Protonenabspaltung durch Protonen-Tunneling am Substrat durch eine konservierte katalytische Base (Asp) im aktiven Zentrum der CAO statt [Farnum et al., 1986; Grant und Klinman, 1989; Mure et al., 2002; Mure et al., 2005; Chiu et al., 2006]. Die Produkt-Schiffsche Base (TPQ_{PSB} – Cu(II)-Hydrochinonaldimin) wird im Anschluss über ein Carbanion schnell gebildet [Mure und Klinman, 1995]. Während der Produkt-Schiffsche Basenbildung werden formal zwei Elektronen vom Amin auf das TPQ_{ox} übertragen. Durch Hydrolyse wird das reduzierte TPQ_{red} in der Aminohydrochinonform (TPQ_{red}) erhalten und der Produktaldehyd wird freigesetzt [Mure und Klinman, 1995]. Die reduktive Halbreaktion erfolgt ohne

Beteiligung von Kupferionen [Kishishita et al., 2003]. Die reduktive Halbreaktion läuft in pflanzlichen und tierischen CAOs formal gleich ab [Padigla et al., 2001b; Agostinelli et al., 2005].

Die Regenerierung des reduzierten TPQs (TPQ_{red}) zum oxidierten TPQ (TPQ_{ox}) erfolgt während der oxidativen Halbreaktion. Eine offene Frage ist hier die Rolle des Kupfers. Mehrere mögliche Funktionen wurden vorgeschlagen. Auch gibt es Unterschiede bei der oxidativen Halbreaktion zwischen pflanzlichen und tierischen CAOs. Bei einer Rinderplasma-Aminoxidase (BPAO), die zur Familie der CAOs zählt, werden vom Aminohydrochinon (TPQ_{red}) zwei Protonen und zwei Elektronen auf Sauerstoff übertragen und es wird Wasserstoffperoxid und ein Iminochinon (TPQ_{IMQ}) gebildet [Wilmot et al., 1999]. Das Kupferion ändert seine Wertigkeit nicht und ist nur der Elektronen-Vermittler zwischen dem Sauerstoff und dem Cofaktor [Kishishita et al., 2003; Chiu et al., 2006; Qiao et al., 2006]. Anschließend wird durch Hydrolyse Ammoniak freigesetzt und aus dem Iminochinon (TPQ_{IMQ}) wird das TPQ_{ox} zurückgebildet [Janes und Klinman, 1991]. Nach Dooley et. al. [1991] und Turowski et al. [1993] liegt bei der Rinderplasma-Aminoxidase das Aminohydrochinon (TPQ_{red}) im Gleichgewicht mit dem Semichinonradikal (TPQ_{sq}) vor. Das Semichinonradikal ist durch eine Disproportionierung aus dem Aminohydrochinon und dem Cu(II) entstanden und nimmt aber an der eigentlichen Reaktion nicht teil. Gleiches wurde bei der Aminoxidase von *Hansenula polymorpha* beobachtet [Mills und Klinman, 2000].

Nach Shepard und Dooley [2006] erfolgt die Regeneration des TPQ_s bei der Aminoxidase von *A. globiformis* über das Semichinonradikal (TPQ_{sq}) zum Iminochinon (TPQ_{IMQ}), so dass hier das Kupferion an der Reaktion teilnimmt.

Bei einer Schweineniere-Aminoxidase wird dem Kupfer eine essentielle Rolle zur Erhaltung der Konformation während der Redoxreaktion im aktiven Zentrum zugesprochen. Es ließ sich kein Semichinonradikal nachweisen [Mura et al., 2006].

Bei pflanzlichen CAOs läuft die oxidative Halbreaktion über die Radikalspezies ab (rote Pfeile in Abbildung 7), so dass hier Kupferionen bei der Regeneration des reduzierten TPQs involviert sind [Longu et al., 2005b; Medda et al., 2006]. Pflanzliche Aminoxidasen werden auch „Proteinradikalenzyme“ genannt [Padigla et al., 2001b]. CAOs haben ähnliche Strukturen, aber funktionieren nach unterschiedlichen kinetischen Mechanismen. In tierischen und pflanzlichen CAOs ist das Kupferion für die Funktion essentiell [Padigla et al., 2001b].

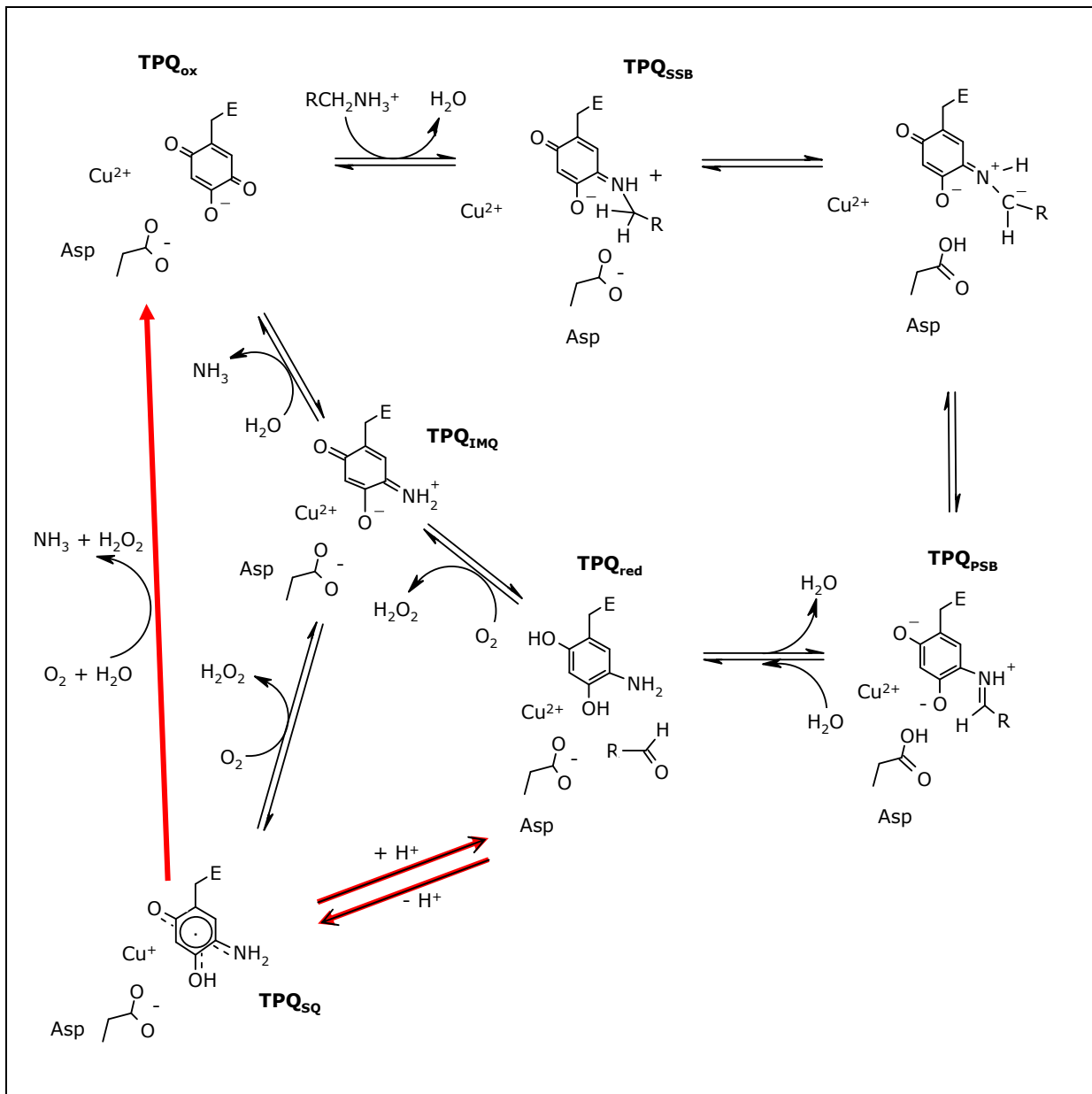


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der reduktiven und oxidativen Halbreaktion im aktiven Zentrum von CAOs. Die oxidative Halbreaktion bei pflanzlichen CAOs ist durch rote Pfeile dargestellt. Erläuterungen im Text [Medda et al., 1998; Padigla et al., 2001a; Mure et al., 2002; Brazeau et al., 2004; Mure, 2004; Agostinelli et al., 2005; Longu et al., 2005b; Chiu et al., 2006; Medda et al., 2006; Shepard und Dooley, 2006].

1.6. Problemstellung

Die Biosynthese des Necinbase-Grundkörpers der Pyrrolizidin-Alkaloide ist bis zur Homospermidinsynthese aufgeklärt und intensiv auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene untersucht worden. Dabei wurden eine Vielzahl von Erkenntnissen über die evolutionären Zusammenhänge erhalten.

Über die weiteren enzymatischen Schritte der Biosynthese ist nicht viel bekannt. Viele Indizien sprechen dafür, dass es sich bei dem nachfolgenden Homospermidin-umsetzendem Enzym um eine kupferhaltige Aminoxidase (CAO) handeln könnte:

- ☐ CAOs oxidieren Polyamine an der primären Aminogruppe zum Aldehyd (siehe 1.5).
- ☐ Anreicherung von Homospermidin bei β -Hydroxyethylhydrazin-Zusatz (siehe 1.3), einem CAO-Hemmstoff.
- ☐ Die „Diaminoxidase“ der Erbse kann Homospermidin zu einem Necinbase-Grundkörper umsetzen [Robins, 1982].
- ☐ Eine CAO bildet zyklische Grundkörper, wie z. B. bei Nicotin, Benzylochinolin- und Tropanalkaloiden (siehe 1.3).

Es wird angenommen, dass im Laufe der Evolution eine Duplikation eines CAO-Gens des Primärstoffwechsels erfolgt ist. Eine der entstandenen Genkopien könnte dann für die spezifische Funktion in der PA-Biosynthese rekrutiert worden sein, ähnlich wie es bei der Rekrutierung der HSS aus einem DHS-codierenden Gen belegt werden konnte [Ober und Hartmann, 1999b]. Diese zum Sekundärstoffwechselenzym umgewandelte CAO kann nur noch Homospermidin als Substrat umsetzen. Die andere Möglichkeit wäre, dass ein Primärstoffwechselenzym sein Substratspektrum vergrößert hat und neben Putrescin außerdem Homospermidin als Substrat umsetzen kann.

Folgende Herangehensweise wurde ausgewählt:

- ☐ Da in der Literatur nur wenige Informationen über pflanzliche CAOs bekannt sind und um die charakteristischen Eigenschaften von CAOs besser kennen zu lernen, sollten bereits näher untersuchte Aminoxidasen als Positivkontrollen dienen, wie die CAO aus *Pisum sativum* (PSAO) sowie die käufliche Aminoxidase des Rinderplasmas (BPAO).
- ☐ Expression eines rekombinanten PSAO-Proteins als Positivkontrolle sowie nähere Untersuchung des Verhaltens von *P. sativum*-Rohextrakten.
- ☐ Etablierung eines Assays zur Enzymaktivitätsmessung und zur Unterscheidung von Primärstoffwechsel- von Sekundärstoffwechselenzymen.
- ☐ Analyse von Enzymaktivitäten in Wurzelextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit dem Substrat Homospermidin und Identifikation von möglichen Produkten.
- ☐ Anreinigung von Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus Wurzelrohextrakten von *Senecio vernalis* und *Eupatorium cannabinum* zur Gewinnung von Aminosäuresequenzinformationen über das Sekundärstoffwechselenzym.

- ❑ Identifizierung von CAO-codierenden Sequenzen auf Nukleinsäureebene in den PA-produzierenden Pflanzen *Senecio vernalis* und *Eupatorium cannabinum* und heterologe Expression der rekombinanten Proteine zwecks biochemischer Charakterisierung.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von folgenden Firmen:

Aldrich	Applichem	Biomol	BioRad
Fluka	Gerbu	Merck	Roth
Serva	Sigma		

Beim Ansetzen von Lösungen wurde, wenn nicht anderes beschrieben wurde, MILLI-Q-Reinigungssystem-(Millipore)-Wasser verwendet. Käuflich erwerbbare radioaktive Substanzen wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

2.2. Kits

- ☐ RNeasy Plant Mini[®] Kit (QIAGEN)
- ☐ GenElute[™] High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit (Sigma)
- ☐ PureYield[™] Plasmid Midiprep System (Promega)
- ☐ DNA Purification Mini Spin Column Kit *PrestoSpin D* Plasmid Midi (Molzym)
- ☐ PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin[®] Extract (MACHEREY-NAGEL)
- ☐ Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)
- ☐ Plasmid DNA Purification NucleoSpin[®] Plasmid (MACHEREY-NAGEL)
- ☐ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- ☐ CONCERT[™] Rapid PCR Purification System (GIBCO)
- ☐ QIAEX II (Qiagen)
- ☐ TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)
- ☐ DNeasy[®] Tissue Kit (QIAGEN)
- ☐ *Pichia* EasyComp[™] Kit (Invitrogen)

2.3. Bakterienstämme - *E. coli*

Stamm	Hersteller	Besonderheiten
TOP10	Invitrogen	<i>LacZAM15</i> -Gen für Blau-Weiß-Screening <i>hsdR</i> unmethylierte DNA <i>endA1</i> hohe Plasmidstabilität und -qualität <i>recA1</i> hohe Plasmidausbeute und -reinheit <i>mcrA</i>
DH5α	Invitrogen	<i>recA1 endA1 LacZAM15</i>
XL1-Blue	Stratagene	<i>endA⁻</i> hohe Plasmidqualität und -ausbeute <i>hsdR recA1 LacZAM15</i>
BL21(DE3)	Novagen	Induktion mit IPTG durch T7-Polymerase durch den <i>lac</i> -Promoter hohe Ausbeuten bei Expressionen schwache Hintergrundexpression der T7-Polymerase keine <i>Ion</i> - und <i>ompT</i> -Proteasen
BL21pLysE (DE3)	Novagen	Expression von toxischen Proteinen geringe Ausbeuten bei Expressionen T7-Lysozym-Gen auf pLysE-Plasmid (Hemmstoff für T7-Polymerase) mit Chloramphenicolresistenz Unterdrückung der Hintergrundexpression

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme.

2.4. Kulturführung von Bakterien

Wirtsorganismen wurden ohne Antibiotikum angezogen. Wenn auf Zellen selektiert werden sollte, die ein Plasmid durch Transformation enthielten, wurde einem Kulturmedium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

2.4.1. Kulturführung

E. coli-Zellen wurden in LB-flüssig-Kulturmedien unter Schütteln (Inkubator: Danfoss, 230 rpm) oder auf LB-Agarplatten bei 37°C angezogen. Zur Selektion der Bakterien wurde sterile Antibiotikum-Stammlösung in der dem/den Vektor(en) nach Herstellerangaben empfohlenen Konzentration(en) zugesetzt.

Antibiotikum-Stammlösung (steril)	Konzentration
Ampicillin (Roth)	100 mg/ml
Kanamycinsulfat (Roth)	100 mg/ml
Tetracyclin (Sigma)	100 mg/ml (in Ethanol gelöst)
Chloramphenicol (Sigma)	100 mg/ml (in Ethanol gelöst)
Streptomycinsulfat (Sigma)	100 mg/ml
Penicillin (Roth)	50 mg/ml

2.4.2. Dauerkulturen

Zur längeren Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden 250 µl LB-Glycerin-Medium und 750 µl einer über Nacht angezogenen Bakterienkultur gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.4.3. Medien

LB-Medium	LB-Platten
Trypton (Pepton) 10 g	vor dem Autoklavieren 16 g Agar pro Liter
Hefeextrakt 5 g	LB-Medium zugesetzt
NaCl 10 g	
Wasser ad 1000 ml	
pH-Wert 7,5 eingestellt, dann autoklaviert.	

M9 Minimalmedium	5x M9-Salze
5x M9-Salze 10 ml	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 18,8 g
MgSO ₄ -Stammlösung 50 µl	KH ₂ PO ₄ 7,5 g
Thiaminstammlösung 5 µl	NH ₄ Cl 2,5 g
Glucose-Stammlösung 500 µl	NaCl 1,25 g
FeSO ₄ -Stammlösung 50 µl	ad 500 ml
in 40 ml autoklaviertem Wasser gelöst.	pH-Wert 7,4 (NaOH), dann autoklaviert.

Stammlösungen (steril)	
MgSO ₄ 1 M	
Thiamin-Hydrochlorid 0,5%	
Glucose 40%	
FeSO ₄ -Lösung 4,2 g/l	

Low Salt LB Medium (LSLB)

Trypton (Pepton)	10 g
NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
Wasser	ad 1000 ml

pH-Wert 7,5 eingestellt, dann autoklaviert.

speziell für Vermehrung von Hefektoren (siehe Tabelle 4) in *E. coli* TOP10-Zellen

LSLB-Agar

vor dem Autoklavieren 16 g Agar pro Liter
LSLB-Medium zugesetzt

LB-Glycerin-Medium

Trypton (Pepton)	1,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	1,0 g
Wasser	ad 40 ml

pH-Wert 7,5 eingestellt, dann 60 ml Glycerin zugegeben und autoklaviert.

zur Dauerkulturherstellung verwendet (siehe 2.4.2)

SOB-Medium

Trypton (Pepton)	4 g
Hefeextrakt	1 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
Wasser	ad 200 ml

pH-Wert 7,5 eingestellt, dann autoklaviert.

SOC-Medium

SOB	100 ml
50% steril. Glucoselösung	800 µl
nach Autoklavieren: steril zugegeben	
1 ml 1 M MgCl ₂ (→ 10 mM)	
1 ml 1 M MgSO ₄ (→ 10 mM)	

Verwendung bei Transformationen
(siehe 2.10.11)

2.5. Hefestämme – *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ist ein eukaryotisches Expressionssystem, das im Gegensatz zum bakteriellen Expressionssystem eukaryotische Proteine korrekter faltet und posttranslationale Modifikationen möglich macht. Außerdem sind bei dieser Hefeart höhere Expressionsraten als bei *Saccharomyces cerevisiae* zu erwarten. *P. pastoris* ist eine methylotrophe Hefe, d. h. sie kann Methanol als Kohlenstoffquelle nutzen. Sie besitzt zwei Gene *AOX1* und *AOX2*, die jeweils für eine Alkoholoxidase codieren. Der *AOX1*-Promotor ist ein sehr starker Promotor. Er ist durch Methanol induzierbar und wird zur Expression von Fremdgenen verwendet. *P. pastoris* kann Proteine sekretieren, aber auch eine intrazelluläre Expression ist sehr effizient. Das *AOX1*-Gen ergibt hohe Ausbeuten an Protein. Das *AOX2*-Gen ist zu 97% homolog zum *AOX1*-Gen und ergibt geringere Ausbeuten an Alkoholoxidase (siehe auch 3.1.1 und 3.7.4).

Stamm	Hersteller	Besonderheiten
KM71H	Invitrogen	<i>arg4</i> – Mutation im Argininosuccinatlyase-Gen <i>aox1::ARG4</i> – <i>AOX1</i> -Gen zerstört durch <i>arg4</i> – Insertation → Zusatz von Arginin zum Medium nötig Genotyp: Mut ^S , Arg ⁺
GS115	Invitrogen	<i>his4</i> – Mutation in Histinoldehydrogenase-Gen → Zusatz von Histidin zum Medium nötig

Tabelle 3: Verwendete *Pichia pastoris*-Stämme.

2.6. Kulturführung von *Pichia pastoris*

2.6.1. Kulturführung

Hefezellen wurden bei 30°C in einem Inkubationsschrank (Innova 4230, New Brunswick Scientific) kultiviert. Bei jeder Inkubation wurde entsprechend dem Volumen des Mediums im Kulturgefäß die Geschwindigkeit des Schüttlers neu eingestellt. Das Medium sollte gut mit Sauerstoff versorgt werden, aber nicht überschäumen (ca. 120-220 rpm).

Nach Transformation (siehe 2.10.11 und 2.10.16.2) von Hefe-Vektoren in *E. coli*- oder in *P. pastoris*-Zellen wurde das Antibiotikum Zeocin® (Invitrogen) in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Medium	Konzentration
LSLB-Medium (siehe 2.4.3)	25 µg/ml
YPD-Medium (siehe 2.6.3)	100 µg/ml
YPDS-Medium (siehe 2.6.3)	100 µg/ml

2.6.2. Dauerkultur

Zur Herstellung von *Pichia pastoris*-Dauerkulturen wurden Hefekolonien in 10 ml YPD (siehe 2.6.3) oder in 10 ml YPG (siehe 2.6.3) über Nacht bei 30°C unter Schütteln angezogen. Vor der Ernte der Zellen in der Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (Rotor GH 3.8, 2000 rpm für 5 min, 4°C) wurde eine OD₆₀₀ der Kulturen bestimmt (siehe 2.10.10), um beim Resuspendieren die Zellen in YPD mit 15% Glycerol (steril) auf eine OD₆₀₀ von 50-100 einzustellen. Die Zellen wurden anschließend sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.3. Medien

Stammlösungen

10x YNB - Yeast Nitrogen Base w/o Ammonium sulfate and amino acids (Difco)	34 g/l + 100 g Ammoniumsulfat/l (sterilfiltriert)
500X Biotin	20mg/100 ml (sterilfiltriert)
10X Dextrose	200 g/1000 ml (autoklaviert)
10X Methanol	5 ml/95 ml Wasser (sterilfiltriert)
10X Glycerol	100 ml/900 ml Wasser (autoklaviert)
1M Kaliumphosphatpuffer	pH-Wert: 6,0 (autoklaviert)

YPDS-Medium

Trypton (Pepton)	20 g
Hefeextrakt	10 g
Sorbitol	182,2 g
Wasser	ad 900 ml
autoklaviert, abgekühlt, dann Zugabe von	
10X Dextrose	100 ml

YPDS-Platten

Zugabe von 20 g Agar pro Liter YPDS-Medium

YPD-Medium

Trypton (Pepton)	20 g
Hefeextrakt	10 g
Wasser	ad 900 ml
autoklaviert, abgekühlt, dann Zugabe von	
10X Dextrose	100 ml

YPD-Platten

Zugabe von 20 g Agar pro Liter YPD-Medium

10X Dextrose: 200g/l autoklaviert

YPG-Medium

Trypton (Pepton)	20 g
Hefeextrakt	10 g
Wasser	800 ml
autoklaviert, abgekühlt, dann Zugabe von	
1 M Kaliumphosphatpuffer	100 ml
10X Glycerol	100 ml
500X Biotin	2 ml

BMMY-Medium

Trypton (Pepton)	20 g
Hefeextrakt	10 g
Wasser	700 ml
autoklaviert, abgekühlt, dann Zugabe von	
1 M Kaliumphosphatpuffer	100 ml
10X Methanol	100 ml
500X Biotin	2 ml
10X YNB	100 ml

2.7. Pflanzenmaterial

2.7.1. *Senecio vernalis* (Asteraceae)

Wurzelorgankulturen (WOK) von *Senecio vernalis* waren am Institut etabliert („Mix-Kultur“).

2.7.1.1. Etablierung einer Klonkultur

Klonkultur-Sterilpflanzen

Achänen von *Senecio vernalis* (Kaltkeimer) wurden vom Pappus befreit und für 24 h bei -20°C eingefroren, um so diese einer künstlichen Kälteperiode auszusetzen. Zur Entfettung der Schale wurden sie für 2 min mit 96% Ethanol behandelt. Anschließend wurden sie mit 6-13% Natriumhypochloridlösung, die mit Wasser 1:3 verdünnt wurde, oberflächensterilisiert und dann mit sterilem Wasser gewaschen. Die sterilen Samen wurden auf MSOH-Agar-Platten (siehe 2.8) gedrückt. Die keimenden Pflanzen wurden der Größe entsprechend in größere MSOH-Agar-Kulturgefäße umgesetzt.

Wurzelorganklonkultur

Wurzeln von Klonkultur-Sterilpflanzen (*Senecio vernalis*) wurden abgeschnitten, mit sterilem Wasser vom Medium befreit und in 10 ml MS10-Medium in 100-ml-Erlenmeyerkolben überführt. Man musste mit einem kleinen Kulturvolumen anfangen und eine größere Menge an Wurzelmaterial überimpfen, damit die Wurzeln wuchsen. Wenn sich genügend Wurzeln gebildet hatten, wurden sie in ein größeres Kulturvolumen umgesetzt.

2.7.1.2. Freiland und Kulturschrank

Achänen von *S. vernalis* wurden vom Pappus befreit und für 24 h bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden sie auf feuchte Blumenerde (COMPO SANA, Compo) gelegt und gut gewässert. Nach einiger Zeit wurden die Keimlinge pickiert. Die Pflanzen wurden im Winter im

Kulturschrank (Typ KLT4 oder Typ KT 2L, Ehret) bei 20°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden oder auf der Fensterbank mit einer Pflanzenlampe bei gleichem Hell-Dunkel-Rhythmus kultiviert. Im Frühjahr und Sommer wurden die Pflanzen auf der Fensterbank, im Gewächshaus sowie Arzneipflanzengarten des Instituts ohne zusätzliche Beleuchtung angezogen. Außerdem wurden Freiland-Pflanzen in der Lüneburger Heide sowie in der Gegend um Braunschweig gesammelt.

2.7.2. *Senecio jacobaeae* (Asteraceae)

Wurzelorgankulturen (WOK) von *Senecio jacobaeae* waren am Institut etabliert.

2.7.3. *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae)

2.7.3.1. Wurzelorgankultur

Wurzelorgankulturen (WOK) von *E. cannabinum* waren am Institut etabliert und wurden in MSOH-Medium kultiviert. Wurzelorganklonkulturen wurden von Dorothee Langel am Institut etabliert und zur Verfügung gestellt.

2.7.3.2. Freiland

Das Pflanzenmaterial wurde von mehrjährigen Stauden im Arzneipflanzengarten des Instituts gesammelt.

2.7.4. *Pisum sativum* var. *medullare* (Fabaceae)

Erbsen „Wunder von Kelvedon“ wurden über Nacht in Wasser eingeweicht und am nächsten Tag auf feuchte Blumenerde gelegt. Das Wachstum fand abgedeckt im Dunkeln statt.

2.8. Steril-Kulturführung von Pflanzen

2.8.1. Lagerung von Pflanzenmaterial

Pflanzenproben wurden von Agar, Medium oder Erde befreit und bis zur weiteren Verwendung im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.8.2. Medien

Spurenelementstammlösung

Borsäure	620 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1000 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5 mg
Wasser	ad 100 ml

Vitaminstammlösung

Nicotinsäure	250 mg
Thiamin HCl	2500 mg
Pyridoxin HCl	250 mg
Mesoinositol	25 g
Wasser	ad 250 ml

Kaliumiodidstammlösung

KI	75 mg
Wasser	ad 100 ml

MSOH-Medium

NH ₄ NO ₃	1650 mg
KNO ₃	1900 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
Saccharose	30 g
EDTA-Eisen-Natriumsalz	40 mg
Inosit	100 mg
KI-Stammlösung	1 ml
Spurenelementstammlösung	1 ml
Vitaminstammlösung	1 ml
Wasser	ad 1000 ml

- ☐ pH-Wert mit 0,5 M Natronlauge auf 5,8 eingestellt.
- ☐ Agarplatten: 4,5 g Agar pro 500 ml MSOH
- ☐ festes Medium: 720 mg Agar zu 80 ml MSOH in einem 200-ml-Erlenmeyerkolben

Wurzelorgankulturen (WOK) wurden im Dunkelkulturraum bei 25°C in 40 bzw. 80 ml Murashige-Skoog-Medium (MSOH) [Murashige und Skoog, 1962] bzw. MS10-Medium (10% an Ammoniumnitrat von MSOH) bei 120 rpm in 100- bzw. 200-ml-Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Wurzeln wurden alle 10 bis 14 Tage überimpft. Die Sterilpflanzen wurden auf MSOH- bzw. MS10-Agar bei 25°C in einem Kulturraum mit einem Tag-Nachtrhythmus von 16 h zu 8 h kultiviert und alle vier Wochen in ein frisches Kulturmedium umgesetzt.

2.9. Vektoren und Primer

2.9.1. Vektoren

Vektor	Hersteller	Größe	Besonderheiten
pPICZB	Invitrogen	3,3 kb	Schaukelvektor = Shuttlevektor für eine Vermehrung von Fremd-DNA in <i>E. coli</i> und dann für eine Übertragung der Fremd-DNA in <i>P. pastoris</i> geeignet AOX-Promotor Zeocin [®] -Resistenz His•Tag am C-Terminus intrazelluläre Expression Linearisierung mit <i>SacI</i> , <i>PmeI</i> u. <i>BstXI</i>
pPICZαA	Invitrogen	3,3 kb	Schaukelvektor (s. o.) extrazelluläre Expression durch α-Faktor (Sekretionssignal von <i>S. cerevisiae</i>) AOX-Promotor His•Tag am C-Terminus Zeocin [®] -Resistenz Linearisierung mit <i>SacI</i> , <i>PmeI</i> u. <i>BstXI</i>
pPICZBmod <i>NdeI</i> pPICZαAmod <i>NdeI</i>	[siehe 2.10.15]	3,3 kb	Derivate von pPICZB und pPICZαA neue <i>NdeI</i> -Schnittstelle zur Linearisierung

Tabelle 4: Verwendete Schaukelvektoren für *E. coli*- und *P. pastoris*-Zellen.

Vektor	Hersteller	Größe	Besonderheiten
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen	3,9 kb	T7-Promoter (siehe 2.12.10) Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz liegt linearisiert vor 3'-Thymidin-Überhänge mit Enzym Topoisomerase direkte Klonierung von PCR-Produkten, die mit der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase amplifiziert wurden
pET3a	Novagen	4,6 kb	T7-Promotor Ampicillin-Resistenz
pET21d	Novagen	5,4 kb	T7lac-Promotor Ampicillin-Resistenz
pET23a	Novagen	3,6kb	T7-Promotor Ampicillin-Resistenz His•Tag am C-Terminus mit Multicloning-Site von pET22a
pET28amod	[siehe 2.10.15]	5,4 kb	Derivat von pET28a <i>Nco</i> I-Schnittstelle gegen <i>Pst</i> I-Schnittstelle ausgetauscht T7lac-Promotor Kanamycin-Resistenz His•Tag am C-Terminus und am N-Terminus
pBSK-GFP-N-Fus	Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig	4,8 kb	codiert Green-Fluoreszen-Protein (GFP) 35S-Promotor Ampicillin-Resistenz
pRDKJG	GBF, Braunschweig Herr Dr. Heinze	7,9 kb	T7lac-Promotor Kanamycin-Resistenz codiert und exprimiert das Chaperon DnaK mit den Co-Chaperonen DnaJ + GrpE

Tabelle 5: Verwendete Vektoren für *E. coli*-Zellen.

2.9.2. Primer (Oligonucleotide)

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert und mit 10 mM TRIS/HCl pH-Wert 8,0 (gelöst in DMPC-Wasser (siehe 2.10.1)) auf eine Konzentration von 100 pmol/μl (Stammlösung) und 1 sowie 10 pmol/μl (Arbeitskonzentration) verdünnt.

2.9.2.1. Degenerierte Primer

Degenerierte Primer wurden verwendet, um CAO-Genfamilien in Pflanzen durch eine PCR zu identifizieren (siehe 2.10.4). Degenerierte Primer sind Oligonucleotidmischungen, die an manchen Nucleotidpositionen verschiedene Basen besitzen. Die degenerierten Primer wurden an Hand eines Alignments entworfen, das aus Aminosäuresequenzen aus Datenbanken entstanden ist (z. B. GeneBank). Dabei wurden hoch konservierte Aminosäuresequenzabschnitte ausgewählt. Der Grad der Degeneriertheit des Primers sollte möglichst klein sein und ergab sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes (siehe 3.3.1).

2.9.2.2. Genspezifische Primer (GSP)

Genspezifische Primer sollten aus mindestens 18-21 Nucleotiden bestehen. Sie waren komplementär zur interessierenden Nukleinsäuresequenz und besaßen meist einen GC-Anteil von etwa 50%. Am 3'-

Ende sollten die letzten fünf Nucleotide nicht mehr als zwei Gs oder Cs enthalten, um ein Verlängern eines unspezifisch angelagerten Primers während einer PCR-Reaktion auszuschließen. Wenn die Primer eine Restriktionsschnittstelle besaßen, wurden ca. 3-6 Nucleotide am 5'-Ende als Adapter angehängt, um so eine hohe Restriktionseffizienz der Restriktionsenzyme zu erreichen (verwendet GSPs siehe Ergebnisteil).

2.10. Molekularbiologische Methoden

2.10.1. Gesamt-RNA-Isolierung

Erst wurden Pflanzenteile von Erde oder Kulturmedium befreit und dann direkt zur Isolierung von Gesamt-RNA mit dem „RNeasy Plant Mini-Kit“ (Qiagen) eingesetzt. Weiterhin wurden bei -80°C gelagerte Pflanzenproben verwendet (siehe 2.8.1). Dabei wurden um die 150 mg Pflanzenmaterial eingesetzt. Die Probe wurde erst mit flüssigem Stickstoff eingefroren, dann homogenisiert und anschließend in einem Puffer, der Guanidinium-Isothiocyanat enthielt, lysiert. Guanidinium-Isothiocyanat inaktiviert RNasen und stabilisiert RNA. Die RNA wurde an eine Silicagelmembran gebunden und durch mehrere Waschstschritte von Kontaminationen befreit. Die Gesamt-RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

Herstellung von DMPC-Wasser (RNase-freies Wasser)

1 g Dimethylpyrocarbonat (DMPC) wurde in einem Gemisch aus 50 ml Ethanol (p. a.) und 50 ml Wasser gelöst. Anschließend wurde mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Diese Lösung wurde über Nacht bei 37°C gelagert und dann zur Inaktivierung des DMPCs autoklaviert.

2.10.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde eine Probe mit Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) mit einem Photometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences) gegen einen Wasser-Blindwert vermessen.

2.10.2.1. Gesamt-RNA und RNA-Reinheitsprüfung

Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt einen Aufschluss über die Reinheit der Gesamt-RNA. Kontaminationen, die das Verhältnis beeinflussen, können UV-absorbierende Substanzen und Proteine sein. Der Quotient für reine RNA sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

Gesamt-RNA-Gehalt [$\mu\text{g/ml}$] = $40 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A_{260}$

Weiterhin wurde die isolierte Gesamt-RNA mit einem Agarose-Gel (siehe 2.10.5) auf Abbau und Größenverteilung der 16S- (1,5 kb), 18S- (1,9 kb) und 23S- (2,9 kb) rRNA-Banden geprüft. Falls die Banden nicht als scharfe Bänder in der richtigen Größe zu sehen waren, sondern in einer kleineren Größe als Schmier, war eine Degradation der Gesamt-RNA während der Präparation eingetreten.

2.10.2.2. Quantifizierung der DNA-Proben

Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm liegt bei reinen DNA-Proben bei 1,8. Geringere Werte bedeuten Verunreinigungen.

DNA-Gehalt [$\mu\text{g/ml}$] = 50 x Verdünnungsfaktor x A_{260}

2.10.3. Herstellung von cDNA

Aus einer isolierten Gesamt-RNA (siehe 2.10.1) wurde mit Hilfe einer Reversen-Transcriptase zur mRNA komplementäre Einzelstrang-cDNA synthetisiert. Als Primer diente ein Oligo-dT-Primer (siehe Tabelle 6), der sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA anlagerte oder ein genspezifischer Primer GSP1 für eine 5'RACE (siehe 2.10.4.2). Es wurden verschiedene Transkriptasen von verschiedenen Herstellern verwendet.

	A	B	C
Gesamt-RNA	x μl (entspricht 1 μg)	x μl (entspricht 1 μg)	x μl (entspricht 1-5 μg)
Oligo-dT-Primer (1 pmol/ μl) oder GSP-Primer (1 pmol/ μl)	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl
DMPC-Wasser	-	2 μl	2 μl
ad	11 μl	13 μl	15 μl
erwärmt	5 min 70°C	5 min 65°C kurz auf Eis gestellt Zugabe des Mastermixes	10 min 70°C
Mastermix	-	-	vorwärmen bei 50°C
Reaktionspuffer gemäß Hersteller	4 μl	4 μl	2 μl
dNTPs (10 mM each)	2 μl	1 μl	2 μl
0,1 M DTT	-	1 μl	-
DMPC-Wasser	2 μl	-	-
Reverse-Transkriptase	5 min 37°C	2 min 55°C	-
Synthese	1 μl (200 U)	1 μl (200 U)	1 μl (20 U)
Inaktivierung	42°C für 1 h	55°C für 1 h	42-65°C für 50 min
		10-15 min bei 70°C	

2.10.3.1. A - RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI-Fermentas)

2.10.3.2. B - SuperScript III - RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen)

2.10.3.3. C - Durascript - Enhanced Avian Reverse Transcriptase (Sigma)

Oligo-Peptid	Sequenz
Oligo-dT-Primer	5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
	für RT-PCR und 3'RACE T_m: 59,5°C

Tabelle 6: Oligo-dT-Primer für cDNA-Herstellung.

2.10.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen *in vitro* mit Hilfe von thermostabiler DNA-Polymerasen [Mullis und Faloona, 1987]. Nach einer Anfangsdenaturierung folgen meist drei Schritte, die in der Regel 30- bis 35-mal wiederholt werden. DNA als Template wird erst denaturiert und dann lagern sich zwei komplementäre Oligonucleotide (Primer) an die DNA-Einzelstränge an (Annealing). Anschließend findet durch eine

DNA-Polymerase eine Verlängerung der beiden Oligonucleotide statt. Der komplementäre DNA-Doppelstrang wird synthetisiert (Elongation). Zum Abschluss wird die amplifizierte DNA häufig bei 72°C inkubiert, um zu gewährleisten, dass alle DNA doppelsträngig vorliegt.

Eine PCR konnte auch für das Screening von Klonen auf Integration von cDNA in die Vektoren von *E. coli* bzw. *P. pastoris* genutzt werden (siehe 2.10.12.3 und 2.10.16.3).

2.10.4.1. Standard-PCR

Für eine Standard-PCR wurde meistens die *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Dieses Enzym hat 5'→3'-Exonuclease-Aktivität, aber keine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität, d. h. sie besitzt keine Korrekturmöglichkeit für falsch eingebaute Nucleotide. Sie ist hitzestabil und ihre optimale Arbeitstemperatur liegt bei 72°C.

„Hot-Start“-Protokoll:

cDNA, Oligonucleotide und Wasser wurden zusammengegeben und in einer PCR-Maschine für 3 min bei 95°C zur Anfangsdenaturierung erhitzt.

	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	ACCU TAQ LA DNA Polymerase MIX
Template		
cDNA	x µl	2 µl
genomische DNA (ca. 40 ng)	-	2,5 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	2,5 µl	2,5 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	2,5 µl	2,5 µl
Wasser	ad 15 µl	ad 15 µl

Zusammensetzung des Mastermix:	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	ACCU TAQ LA DNA Polymerase MIX
10X PCR-Buffer	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs (10 mM each)	0,5 µl	0,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl	0,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl	-
ACCU TAQ LA DNA Polymerase MIX (0,05 U/µl)	-	0,125 µl
Wasser	6,125 µl	6,875 µl
Σ	10 µl	10 µl

10 µl Mastermix wurden erst nach der Anfangsdenaturierung zugefügt, um ein unspezifisches Binden der thermostabilen DNA-Polymerase am 3'-Ende der Oligonucleotide und eine Elongation unspezifischer DNA-Fragmente zu verhindern. Dann erfolgten die Denaturierung, das Annealing der Primer und die Elongation in 30 bis 35 Zyklen. Die Annealing-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der Primer (etwa $T_m - 5^\circ\text{C}$).

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung			
A	95°C	45 sec	} 30-35 x
B	94°C	30 sec	
Annealing	35 – 75°C	1 min	
Elongation			
A	72°C	2-3 min	
B	68°C	10-20 min	
Extension			
A	72°C	10 min	
B	68°C	10-20 min	
Kühlung	15°C	∞	

A: *Taq*-DNA-Polymerase

B: ACCU TAQ LA DNA Polymerase MIX

„Touch Down“-Programm:

Bei einer Verwendung von Primerpaaren mit sehr unterschiedlichen Schmelztemperaturen konnte ein „Touch Down“ PCR-Programm diesen Unterschied kompensieren. Die Annealing-Temperatur änderte sich bei jedem Zyklus um -0,5°C, wobei mit der höchsten Temperatur begonnen wurde. Nach 20 Zyklen wurde die erreichte Annealing-Temperatur für weitere 20 Zyklen konstant gehalten. Ein Beispiel-Programm für eine Touch-Down-PCR sieht wie folgt aus:

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung			
A	95°C	45 sec	} 20 x
B	94°C	30 sec	
Annealing	65°C	1 min	
Elongation			
A	72°C	2-3 min	} -0,5°C/Zyklus
B	68°C	10-20 min	
Denaturierung			} 20 x
A	95°C	45 sec	
B	94°C	30 sec	
Annealing	55°C	1 min	
Elongation			
A	72°C	2-3 min	
B	68°C	10-20 min	
Extension			
A	72°C	10 min	
B	68°C	10-20 min	
Kühlung	15°C	∞	

A: *Taq*-DNA-Polymerase

B: ACCU TAQ LA DNA Polymerase MIX

(die Annealing-Temperatur variierte je nach Versuch - siehe Ergebnisteil)

2.10.4.2. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE-Technik)

Mit Hilfe der RACE-Technik kann man zu bekannten cDNA-Fragmenten von mRNA bzw. cDNA-Templates die unbekannten, äußeren Bereiche der Sequenz am 3'- bzw. am 5'-Ende erhalten.

3'RACE

Bei einer 3'RACE werden unbekannte 3'-Enden von Sequenzen amplifiziert. Eine mRNA besitzt am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz. Nach einer RT-Reaktion zur Herstellung von cDNA (siehe 2.10.3) wurde bei einer PCR (siehe 2.10.4) nochmals der Oligo-dT-Primer (10 pmol/μl) (siehe Tabelle 7) gegen einen GSP-Primer (10 pmol/μl) verwendet, um den Sequenzbereich zwischen dem GSP-Primer und dem Poly-A-Schwanz zu erhalten.

5'RACE

Die 5'RACE-Technik ist eine "anchored" PCR, bei der unbekannte 5'-Enden amplifiziert und identifiziert werden können.

Gesamt-RNA (siehe 2.10.1) wurde mit Hilfe eines GSP1-Primers durch eine Reverse-Transcriptase (Durascript oder SuperScript III) in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3). Nach einer RNase H- (1 U; Invitrogen) und RNase T2-Behandlung (1 U; Invitrogen) für 30 min bei 37°C zum Abbau von RNA-DNA-Hybriden sowie zur unspezifischen Hydrolyse von RNA fand eine Säulen-Reinigung mit dem MN Nucleo-Spin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel) statt. Mit Hilfe der Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase [rTDT] (Invitrogen) wurde an die gereinigte cDNA mit 2 mM dCTPs ein Poly-C-Schwanz angehängt. Somit entstand eine Bindungsstelle am 5'-Ende der cDNA für den Abridged-Anchor-Primer (AAP). Dabei wurden 15 μl cDNA, 5 μl 5x Tailing Buffer, 2,5 μl dCTPs und 1,5 μl DMPC-Wasser (siehe 2.10.1) gemischt, zur Denaturierung und damit Aufhebung von Sekundärstrukturen für 2,5 min auf 94 °C erhitzt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Es wurde 1 μl rTDT (15 U) zugefügt, vorsichtig gemischt, für 10 min bei 37°C und anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert. Für eine PCR (siehe 2.10.4.1) wurde die getailte cDNA als Template eingesetzt und mit einer Mischung aus zwei Primern das unbekannte 5'-Ende der Sequenz amplifiziert. Es wurden Primer-Kombinationen bestehend aus dem GSP2-Primer bzw. GSP3-Primer, dem Abridged-Anchor-Primer (AAP) oder dem Abridged-Universal-Amplification-Primer (AUAP) (siehe Tabelle 7) in nested sowie semi-nested PCR angewendet.

Oligo-Peptid	Sequenz
Oligo-dT-Primer	5'-GTC GAC TCG AGA ATT CTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
	3'RACE T_m: 59,5°C
Abridged-Anchor-Primer (AAP)	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3'
	5'RACE T_m: 77,4°C
Abridged-Universal-Amplification-Primer (AUAP)	5'-GC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'
	5'RACE T_m: 65,7°C

Tabelle 7: Oligopeptide für RACE-PCR.

2.10.4.3. Full-Length-PCR

Eine Full-Length-PCR wurde bei einer Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens zur Klonierung in Expressionsvektoren angewendet. Dazu wurden Expressionsprimer und eine DNA-Polymerase verwendet, die eine Proofreading-(3'→5')-Exonuclease-Aktivität besitzt, d. h. falsch eingebaute Nucleotide wurden korrigiert. Die Platinum *Pfx*-DNA-Polymerase (Invitrogen) ist an einen spezifischen Antikörper gebunden, der einen „automatischen Hot-Start“ bei der PCR möglich macht. Die Genauigkeit ist laut Hersteller ca. 26-mal höher als bei der *Taq*-DNA-Polymerase.

Reaktionsmischung:

Template (cDNA siehe 2.10.3)	1-3 µl
Expressionsprimer forward (10 pmol/µl)	1 µl
Expressionsprimer reverse (10 pmol/µl)	1 µl
Wasser	ad 15 µl

Mastermix:

10X <i>Pfx</i> Amplification Buffer	2,5 µl
dNTPs (10mM each)	0,75 µl
MgSO ₄ (50 mM)	0,50 µl
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,25 µl
Wasser	6,0 µl
Σ	10 µl

Nach Zusammenfügen der Komponenten erfolgte eine Anfangsdenaturierung für 5 min bei 95°C, bevor ein PCR-Programm gestartet wurde (siehe 2.10.4.1).

2.10.4.4. „Long and Accurate“-PCR

Die „Long and Accurate“-PCR (LA-PCR) kombiniert eine hochleistungsfähige, thermostabile Polymerase mit einer zweiten thermostabilen Proofreading-Polymerase. Für eine Amplifikation mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) braucht man längere Elongationszeiten (bis zu 20 Minuten) und effektive DNA-Denaturierungen. Bei der Annealing-Temperatur können Temperaturen über 70°C verwendet werden und die optimale Elongationstemperatur liegt bei 68°C. Es wurde der ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX bei genomischer DNA und „schwierigeren“ Templates verwendet (siehe 2.10.4.1). Die Genauigkeit ist laut Hersteller etwa 6,5-mal größer als bei der *Taq*-DNA-Polymerase.

2.10.4.5. RT-PCR (Reverse Transcription)

Um den Transkriptionsort sowie die Transkriptionsstärke der verschiedenen CAO-homologen cDNAs in *Senecio vernalis* zu überprüfen, wurde aus verschiedenen Geweben einer Wildpflanze, Wurzelorgankulturen und Sterilpflanzen Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.10.1). Ca. 1 µg Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3) und bei einer PCR eingesetzt (siehe 2.10.4). Als Positivkontrolle diente eine verdünnte Minipräparation-Plasmidprobe (siehe 2.10.9) einer bekannten cDNA. Nach dem vollständigen Ablauf des PCR-Programmes bzw. nach jeweils 24, 28, 32, 36 und 40

Zyklen wurden 4 µl Probe aus dem PCR-Gefäß entnommen und mit einer Agarosegelelektrophorese (1% Agarosegel) analysiert (siehe 2.10.5).

2.10.5. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um DNA bzw. RNA nach ihrer Größe zu trennen. Auch lassen sich DNA-Moleküle mit Hilfe von Agarosegelen aufreinigen.

Es wurden 0,8% bis 2% Agarosegele hergestellt, je nach Größe des zu erwartenden Fragments. Agarose (NEEO Ultra - Qualität, ROTI®GAROSE, Roth) wurde in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 1x TBE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen zum Sieden erhitzt. Die Lösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt, 1 µl Ethidiumbromid (Roth) pro 25 ml Gel zugesetzt und unter einem Abzug in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer (BioRad). Nach Auspolymerisieren des Agarosegels wurden Proben mit Loading Buffer (Verhältnis: 1:2 (v/v)) versetzt. Das Gel wurde in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und die Proben in die Geltaschen gefüllt. Eine konstante Spannung von 80 mV wurde eingestellt. Die Größenabschätzung der DNA-Banden erfolgte durch eine 100-bp-DNA-Leiter (Invitrogen) und eine 1-kb-DNA-Leiter (Invitrogen). Diese (3 µl) wurden neben den Proben auf das gleiche Gel aufgetragen. Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung wurde mit Hilfe des MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkalierte mit den Basen der Nukleinsäuren. Durch UV-Lichtanregung wurde der Ethidiumbromid-Nukleinsäurekomplex als leuchtende Bande sichtbar.

1 kb-Leiter		100 bp-Leiter	
Leiter	30 µl	Leiter	30 µl
Loading Buffer	370 µl	Loading Buffer	360 µl
10% SDS-Lösung	3 µl	10% SDS-Lösung	3 µl
		1 M NaCl-Lösung	8 µl

Leiter-Mix für 3 min bei 65°C erwärmt, bei 4°C gelagert.

10x TBE-Puffer		Loading Buffer	
TRIS Base	108 g	Xylencyanol	0,025%
Borsäure	55 g	Bromphenolblau	0,025%
EDTA	7,3 g	Ficoll 400	25%
Wasser	ad 1000 ml	EDTA	50 mM
1x TBE-Puffer: 10x TBE-Puffer mit Wasser 1:10 verdünnt.		Lösung filtriert und autoklaviert.	

2.10.6. Klonierung mit TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)

Mit dem TOPO TA Cloning® Kit können, die mit der *Taq*-DNA-Polymerase erzeugten PCR-Produkte direkt in den PCR®2.1-TOPO®-Vektor kloniert werden (siehe Tabelle 5). Der linearisiert vorliegende Vektor besitzt an den Enden einzelne 3'-Thymidin-(T)-Überhänge. Bei einer PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase werden einzelne 3'-Deoxyadenosin-(A)-Überhänge am Amplifikat gebildet und somit

kann die kovalent am Vektor gebundene Topoisomerase I das PCR-Produkt in den PCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ligieren [Shuman, 1994].

Ein PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines niedrig-schmelzenden Lo-melt (LMP) Agarosegels (Helena BioSciences) aufgetrennt (siehe 2.10.5) und eine erwartete Bande ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde bei 70°C geschmolzen und 2 µl davon in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, das 2 µl 37°C warmes Wassers enthielt, um zu verhindern, dass die kleine Agarosegelmenge fest wurde. Nacheinander wurden 0,5 µl Salt Solution (37°C) und 0,5 µl PCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor zugegeben, gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann vorsichtig zu 25 µl kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen (siehe Tabelle 2) pipettiert. Anschließend wurde eine Transformation durchgeführt (siehe 2.10.11). Der gesamte Transformationsansatz wurde auf LB-Platten (siehe 2.4), die mit 40 µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) und 15 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) vorbehandelt waren, aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag konnten positive Klone durch ein Blau-Weiß-Screening (siehe 2.10.12.1) identifiziert werden.

2.10.7. Restriktionen

Zur Restriktion von DNA-Molekülen wurden Restriktionsendonucleasen verwendet. Diese schneiden in bestimmten Erkennungssequenzen der DNA. Die Erkennungssequenzen der Endonucleasen bestehen meist aus palindromischen Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Bei dieser Spaltung wird die DNA entweder in der Mitte getrennt, so dass glatte Enden (blunt ends) entstehen oder die DNA wird versetzt geschnitten, so dass kurze überstehende Einzelstrangabschnitte (sticky ends) entstehen.

Restriktionsschnittstellen wurden beim Entwurf von Expressionsprimern am 5'-Ende angefügt. Zusätzlich wurde ein Adapter vor dieser Schnittstelle gehängt, da die Spaltungseffizienz ansteigt, wenn die Schnittstelle des Restriktionsenzym sich nicht unmittelbar am Ende der Oligonucleotid-Sequenz befindet.

Standard-Doppelverdau-Reaktionsansatz:		Gegebenenfalls wurde das Gesamtvolumen dem Restriktionsansatz den verschiedenen Versuchsbedingungen angepasst.
DNA		x µl
Restriktionsenzym 1 (10 U)		y µl
Restriktionsenzym 2 (10 U)		z µl
10x Reaktionspuffer		1,5 µl
BSA (100 µg/ml)		w µl
Wasser		ad 15 µl
↓		
Inkubation des Reaktionsgemisches für 3 h bzw. 20 h bei dem Temperaturoptimum der speziellen Restriktionsendonucleasen.		
↓		
Inaktivierung der Endonucleasen für 20 min bei 65°C bzw. 80°C.		

Wenn die beiden Restriktionsenzyme nicht im selben Puffer eine 100%ige Aktivität aufwiesen, wurde entweder ein anderer Puffer ausgewählt, in dem beide eine verhältnismäßig hohe Aktivität haben, oder

die Restriktionen mit den beiden Enzymen fanden nacheinander statt. Dabei wurde mit dem Enzym, das im Puffer mit einer geringeren Salzkonzentration schneidet, begonnen. Dann erfolgte eine Inaktivierung dieses Restriktionsenzym. Die Restriktion mit dem Enzym, das im Puffer mit einer höheren Salzkonzentration schneidet, schloss sich an. Die Reinigung des Restriktionsansatzes erfolgt über Agarosegelelektrophorese (siehe 2.10.5) mit anschließender Säulenreinigung (siehe 2.10.9.1).

2.10.8. Ligation

Um einen gereinigten, linearisierten Vektor mit einem gereinigten, geschnittenen DNA-Fragment zu verknüpfen, wurde eine Ligation durchgeführt. Dazu wurde eine T4-DNA-Ligase (Invitrogen) verwendet. Dieses Enzym repariert in Zellen Brüche in DNA-Molekülen, d. h. sie katalysiert Verknüpfungsreaktionen zwischen 3'-Hydroxylgruppen mit 5'-Phosphatgruppen zwischen blunt-End-als auch sticky-end-DNA. Diese Aktivität wurde hier zur Ligation verwendet.

Das molare Verhältnis zwischen Insert- und Vektor-DNA sollte 1 zu 10 betragen. Um die korrekten Mengen einzusetzen, wurde eine Verdünnungsreihe der Insert-DNA sowie der Vektor-DNA auf einem Agarosegel aufgetragen und die Verhältnisse abgeschätzt.

Standard-Ligationsansatz:

T4-DNA-Ligase (2 U/μl)	1 μl
5x Ligase Buffer	2 μl
Vektor	x μl
Insert	y μl
Wasser	ad 10 μl

Der Ligationsansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert und anschließend für eine Stunde bei 25°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Bei einer Ligation von blunt-end-DNA konnte durch Zusatz von 50% PEG 4000 in einer Konzentration von 15% in der Ligationsmischung die Ligationseffizienz gesteigert werden [Sambrook et al., 1989].

2.10.9. Isolierung und Reinigung von DNA

Eine DNA-Lösung wurde auf eine Silicat-Membran in einem Zentrifugensäulchen aufgetragen oder mit Silicalgel-Partikeln versetzt. Die doppelstrangige DNA wurde an der Membran bzw. den Partikeln adsorbiert, Enzyme, Puffer, Primer, dNTPs und andere Substanzen wurden durch Waschschrte entfernt und anschließend die DNA mit 10 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8; 70°C) eluiert. Auch erfolgte eine DNA-Isolierung bzw. -Reinigung durch eine Handmethode.

2.10.9.1. Gelreinigung und Säulenreinigung von DNA-Proben

Zur direkten Reinigung von PCR-Produkten aus einem PCR-Reaktionsansatz wurden das CONCERT™ Rapid PCR Purification System (Gibco) und das NucleoSpin® Extract PCR clean-up-Protokoll (Macherey-Nagel) verwendet. Um DNA-Proben aus einem Agarosegel aufzureinigen wurde das NucleoSpin® Extract Kit for Gel extraction (Macherey-Nagel) und das QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) angewendet. Eine weitere Möglichkeit zur Reinigung sowie zur Konzentrierung von

DNA-Proben war eine Agarose-Gelextraktion bzw. eine direkte Reinigung mit dem QIAEX II-Kit (QIAGEN).

2.10.9.2. Mini-Präparationen von Plasmid-DNA

Zur Reinigung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen wurden das Nucleo-Spin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel) und das Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) verwendet.

2.10.9.3. Midi-Präparationen

Zur Präparation von Plasmiden in reiner Form und in hohen Konzentrationen wurden folgende Kits verwendet: GenElute™ High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit (Sigma) und PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega).

2.10.9.4. Mini-Präparationen von Plasmid-DNA (Handmethode)

Minipräparationen von Plasmid-DNA können nach einer modifizierten Methode nach Birnboim und Doly [1979] sowie Ish-Horowicz und Burke [1981] durch eine alkalische Lysis der Bakterienzellen erreicht werden.

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 7 ml LB-flüssig-Medium mit Antibiotikum über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezogen (siehe 2.4.1). 1,5 ml (High-copy Plasmide) und 3 ml (Low-copy Plasmide) Kultur wurden für 3 min bei 6000 rpm (Haraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand an LB-Medium wurde restlos entfernt, das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert und kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurde zur Zelllysis 400 µl frisch angesetzte Lösung II zugegeben, durch Schwenken über Kopf vorsichtig gemischt und genau für 5 min auf Eis gestellt. Zum Fällern von genomischer DNA sowie zum Abstoppen der Lysis wurden 300 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung zugegeben, vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Dann wurde das Gefäß für 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 580 µl Isopropanol gefülltes Eppendorfgefäß überführt, 10 min bei Raumtemperatur zum Fällern der Plasmid-DNA inkubiert und dann für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette möglichst vollständig entfernt. Das Pellet wurde entweder bei Raumtemperatur oder für 10 min bei 37°C im Heizblock getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde in 50 µl 10 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8,0) gelöst und mit 0,5 µl RNase A-Lösung (500 µg/ml, DNasefrei) für 30 min bei 37°C inkubiert, um so die bakterielle RNA abzubauen.

Lösung I

Glucose-Monohydrat	50 mM (0,99 g)
TRIS Base	25 mM (0,30 g)
EDTA	10 mM (0,37 g)
Wasser	ad 100 ml
pH-Wert 8,0, autoklaviert.	

Lösung II

2 M NaOH	0,2 M
10% SDS	1 %

RNase A-Stammlösung 10 mg/ml
(Roth, Roche)

2.10.10. Kompetente *E. coli*-Zellen

Die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Cohen et al. [1972]. Von einer Übernachtskultur (siehe 2.4.1) wurden 550 µl in 50 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4 bis 0,5 angezogen. Die optische Dichte wurde bei 600 nm mit einem Photometer in Kunststoffküvetten ($d = 1\text{cm}$) gegen einen LB-Medium-Blindwert gemessen. Die Bakterienkultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 3800 rpm (GS-6R Zentrifuge, Ausschwingrotor GH 3.8, Beckmann-Tischzentrifuge) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 25 ml einer eisgekühlten 0,1 M Calciumchlorid-Lösung vorsichtig resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde bei 4°C für 5 min bei 3800 rpm zentrifugiert und das Pellet wurde wieder vorsichtig in 5 ml einer eisgekühlten 0,1 M Calciumchloridlösung mit 15% Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die höchste Transformationseffizienz wurde nach 12-24 h Lagerung bei 4°C erreicht. Die nun kompetenten Bakterienzellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.10.11. Transformation

Zur Transformation von DNA wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen (siehe 2.10.10) langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5-10 µl Ligationsansatz (siehe 2.10.6 und 2.10.8) oder 0,2 µl reine Plasmid-DNA (siehe 2.10.9) zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. In einem 42°C warmen Wasserbad wurden die Bakterienzellen einem Hitzeschock für 90 Sekunden ausgesetzt. Anschließend wurden sie für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 200 µl auf Raumtemperatur temperiertem SOC (siehe 2.4.3) versetzt. Zur Expression von Antibiotikaresistenzgenen wurden sie für eine Stunde bei 37°C geschüttelt und dann auf LB-Mediumplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum aufgetragen. Die Platten wurden für 12-14 Stunden bei 37°C inkubiert (siehe 2.4).

2.10.12. Identifikation von positiven Klonen

Ob eine Ligation eines PCR-Produktes in einen Vektor sowie die anschließende Transformation erfolgreich war, konnte durch verschiedene Methoden festgestellt werden. Die nach der Transformation auf der Mediumplatte vorhandenen Bakterienkolonien wurden dabei auf das Vorhandensein der jeweiligen Fremd-DNA untersucht.

2.10.12.1. Blau-Weiß-Screening

Bei dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) fand ein Blau-Weiß-Screening zur Unterscheidung von Bakterienkolonien mit oder ohne Insert im Klonierungsvektor statt (siehe 2.10.6). Die *E. coli* TOP10-Zellen (*lacZ*Δ*M15*) sowie der Vektor (*lacZ*α) besitzen jeweils einen Teil des *lacZ'*-Gens, das die β-Glucosidase codiert. Das *LacZ'*-Gen im Vektor codiert das N-terminale α-Fragment des Enzyms und

das *LacZ'*-Gen der *E. coli* TOP10-Zellen codiert das C-terminale ω -Fragment. Die Aktivität der β -Glucosidase wird durch α -Komplementation hergestellt, also durch Zusammenlagerung der vom Vektor und im *E. coli*-Genom codierten Genprodukte. Da das *LacZ'*-Gen im Vektor durch Ligation von Fremd-DNA in die Multicloning-Site des Vektors zerstört wird, können die rekombinanten *E. coli*-Zellen keine β -Glucosidase mehr bilden. Das Enzym baut Lactose zu Glucose und Galactose ab, kann aber auch ein Lactoseanaloges (X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) spalten, so dass ein blaues Reaktionsprodukt entsteht, das ein Blau-Weiß-Screening ermöglicht. Klone mit Insert sind farblos und Klone mit leerem Vektor sind blau.

2.10.12.2. Restriktionen der Plasmid-Extraktionen

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung, ob sich ein PCR-Produkt nach einer Ligation in einem Vektor befindet, war eine Restriktion von Minipräparationen von Plasmiden (siehe 2.10.9.4) sowie Spin-Plasmidextraktionen (siehe 2.10.9) mit Restriktionsenzymen. Dabei fand ein Abbau in mehrere Fragmente oder eine Linearisierung des Plasmids statt.

Restriktionsansatz

Plasmid-DNA	3 μ l
Restriktionsenzym 1 (1 U)	x μ l
(und Restriktionsenzym 2 (1 U))	y μ l
10x Reaktionspuffer	0,4 μ l
BSA (100 μ g/ml)	z μ l
Wasser	ad 4 μ l

Inkubation des Reaktionsgemisches für eine Stunde bei dem
Temperaturoptimum der speziellen Restriktionsendonucleasen.

Nach der Restriktion erfolgte eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.10.5), bei der das DNA-Bandenmuster einen Hinweis gab, ob die erwarteten Fragmente vorhanden waren.

2.10.12.3. PCR-Screening

Mit Hilfe des PCR-Screenings konnte man Klone auf eine erfolgreiche Integration einer Fremd-DNA in einen Vektor testen. Die Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in 20 μ l sterilem Wasser in einer Mikrotiterplatte suspendiert. Von dieser Suspension wurden 10 μ l in PCR-Tubes gefüllt. Als Negativkontrolle diente 10 μ l steriles Wasser, mit dem die LB-Mediumplatte an einer Stelle ohne Bakterienkolonie wiederholt gespült wurde. Als Positivkontrolle wurden 10 μ l einer 1/100 bzw. 1/1000 mit Wasser verdünnten Plasmid-Präparation verwendet (siehe 2.10.9.4 und 2.10.9). In einer PCR-Maschine wurde ein Temperatur-Programm zum Zellaufschluß verwendet.

96°C	15 sec	} 2 x
96°C	5 min	
50°C	90 sec	
96°C	90 sec	
45°C	1 min	
96°C	1 min	
40°C	1 min	}
15°C	∞	

Nach Aufschluss der Zellen wurden 15 µl Mastermix zu den 10 µl Suspension im PCR-Tube zugesetzt, der neben den Primern, dNTPs, Puffer auch die *Taq*-DNA-Polymerase enthält. Die PCR wurde nach Standardbedingungen durchgeführt (siehe 2.10.4.1). Das Ergebnis des PCR-Screenings wurde mit einer Agarosegelelektrophorese (siehe 2.10.5) analysiert. Von positiv getesteten Klonen wurden die verbliebenen 10 µl der suspendierten Zellen in der Mikrotiterplatte zum Animpfen einer Kultur zur Plasmid-Isolierung verwendet (siehe 2.10.9.4).

2.10.13. DNA-Fällung mit Ethanol

Das Konzentrieren von Nukleinsäuren kann durch eine Ethanolfällung erfolgen. Durch den Zusatz von Ammoniumacetat wird ein Ausfällen von dNTPs sowie Oligonucleotiden reduziert. Zur DNA-Probe wurden ein Volumenteil 7,5 M Ammoniumacetatlösung und 6 Volumenteile Ethanol gegeben. Die Lösung wurde gemischt und 30 min bei 4°C stehengelassen. Danach wurde für 30 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert (Sigma Laborzentrifugen 1K15). Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol (4°C, (v/v)) gewaschen und 15 min bei 4°C für 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet luftgetrocknet und bei – 20°C gelagert.

2.10.14. Sequenzierung und Sequenzauswertung

2.10.14.1. Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden 1,5 µg gereinigte Plasmid-DNA (siehe 2.10.9.2) luftgetrocknet und zur MWG Biotech AG zum Sequenzieren geschickt.

Oligo-Peptid	Sequenz
M13uni	5'-CTG GCC GTC GTT TTA C-3'
	Sequenzierprimer in Vorwärtsrichtung (5'→3') für pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor
M13rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
	Sequenzierprimer in reverser Richtung (3'→5') für pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor
sab1	5'-GGC CTT GAT TCC CTT TCA TC-3'
sab3	5'-GGA CTA CAA ACC ACG TCA TC-3'
sab5	5'-CGG ACA TTC GAG CTA TCA GT-3'
sd1	5'-T CCC AGT TTG CCC ACT TTA C-3'
sabine1	5'-ATC CTT TTG CCC TCC TCA TC-3'
Primer 35S	5'-GCT AGT GGA TTG ATG TGA TAT CTC C-3'
	Sequenzierprimer für pBSK-GFP-N-Fus-Vektor
AOX1-FOR	5'-GCA TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'
	Sequenzierprimer forward für pPICZ-Vektor
AOX1-REV	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'
	Sequenzierprimer reverse für pPICZ-Vektor

Tabelle 8: Verwendete Sequenzierprimer.

2.10.14.2. Sequenzauswertung

Für eine Sequenzauswertung wurden folgende Programme und Tools verwendet:

GCG-Paket

Das Softwarepaket „Wisconsin Package“ der Firma Accelrys (früher Genetics Computer Group), bekannt unter dem Namen GCG-Paket, enthält über 200 Anwendungen zur Sequenzanalyse von Nukleinsäuren und Proteinen.

Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)

Dieses Programm kann Sequenz-Dateien von Applied Biosystems und Amersham öffnen. Es ermöglicht DNA-Sequenzen anzusehen, zu editieren und zu drucken.

GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>)

Dieses Programm ist ein „Multiple-Sequence-Alignment-Editor“, Analysator und Schattierungstool. Man kann Alignments von Aminosäure- sowie Nukleinsäuresequenzen erstellen, wenn sich diese im „multi sequence format“ befinden.

TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)

TreeView ist ein einfaches Programm, um Phylogenien graphisch anzeigen zu lassen.

ClustalX (<http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>)

Mit ClustalX können Aminosäuresequenzen und auch Nukleinsäuresequenzen in einem Multiplen-Sequenz-Alignment dargestellt werden. Es analysiert die Ergebnisse und stellt sie farblich dar. Die Sequenzähnlichkeiten kann man sich auch als baumartige Struktur in der Art eines phylogenetischen Baumes mit der Software TreeView anzeigen lassen.

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

Das **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool (BLAST) findet zwischen Sequenzen Regionen lokaler Ähnlichkeiten. Das Programm vergleicht Nucleotid- oder Proteinsequenzen mit den Sequenzen in der Datenbank und gibt die statistische Trefferquote an. BLAST gibt Hinweise zur Identifizierung von Genfamilien.

tair Restriction Analysis

(<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>)

Mit diesem Internet-Tool können Sequenzen auf Restriktionsschnittstellen untersucht werden. Es gibt an, welche Restriktionsenzyme und wo diese in der Sequenz schneiden sowie welche Endonucleasen die untersuchte Sequenz nicht schneiden.

ExPASy (<http://www.expasy.org/>)

ExPASy (**Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem) ist ein Proteomics-Server vom Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), der zur Analyse von Proteinsequenzen und -strukturen sowie 2-D PAGE-Daten dient.

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/psort/psortII>)

Der SignalP 3.0 Server sagt das Vorhandensein sowie den Ort von Signalpeptidspaltungsstellen in Aminosäuresequenzen voraus.

TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)

TargetP 1.1 erlaubt Vorhersagen über die subzelluläre Lokalisation von eukaryotischen Proteinen.

PSORT (<http://www.psort.org/>)

Bei PSORT werden Links zur PSORT Programmfamilie zur subzellulären Lokalisation von Proteinen dargestellt.

TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

TMHMM ermöglicht Vorhersagen über Transmembran-Helices in Proteinen.

ProtParam tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html#protparam>)

Dieses Tool ermittelt physikalische und chemische Parameter einer Proteinsequenz (Molekulargewicht, theoretischer pI, Aminosäurezusammensetzung, u. a.).

Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)

Hiermit kann der theoretische pI and das Molgewicht eines Proteins berechnet werden.

The PredictProtein Server und Protein Structure Software and Server (SCRATCH)

(<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/>) (<http://www.igb.uci.edu/servers/psss.html>)

Dies ist ein Service zur Sequenzanalyse und -vorhersage.

2.10.14.3. ESI-MS/MS-Sequenzierung von Proteinen/Peptiden

Zur ESI-MS/MS-Sequenzierung von Proteinen mussten die Proteine zunächst durch eine SDS-PAGE getrennt und gereinigt werden (siehe 2.12.1). Dann wurde die Proteinbande mit einem Skalpel aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Das Gelstück wurde mit 500 µl sterilem Wasser durch mehrfaches Hochsaugen der Flüssigkeit mit einer Pipette gespült und dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Das Wasser wurde vollständig abgenommen, das Gel bei Raumtemperatur im offenen Eppendorf-Gefäß getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert. Eine Sequenzierung erfolgte in der Gesellschaft für Biologische Forschung Braunschweig (jetzt Helmholtz zentrum für Infektionsforschung) durch ESI-MS/MS-Sequenzierung durch Herrn Dr. Manfred Nimtz.

2.10.15. Site-Directed Mutagenesis

Mit Hilfe einer „Site-Directed Mutagenesis“ können Punktmutationen vorgenommen, Aminosäuren ausgetauscht und einzelne oder mehrere Aminosäuren in die Sequenz eines Vektors bzw. Plasmids eingefügt werden.

2.10.15.1. pET28amod-Vektor

Im pET28a-Vektor (siehe Tabelle 5) sollte die *NcoI*-Schnittstelle in der Multicloning-Site gegen eine *PstI*-Schnittstelle ausgetauscht werden (siehe 3.7.1.1). Nach dem Design der Primer gemäß der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit-Anleitung (Stratagene) wurde eine PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) durchgeführt. Diese Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität, d. h. sie entfernt Fehler während der DNA-Strangsynthese durch eine so genannte Proofreading-Aktivität.

pET28a-Vektor-DNA (30 ng)	1 µl
SD-for-PstIpET28amod-Primer (10 pmol/µl) (siehe Tabelle 43)	1 µl
SD-rev-PstIpET28amod-Primer (10 pmol/µl) (siehe Tabelle 43)	1 µl
Wasser	40 µl
10X Reaction Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM each)	1 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/µl)	1 µl
	Σ 50 µl

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	95°C	30 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 18 x
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	68°C	11 min	
Elongation	68°C	10 min	
Kühlung	15°C	∞	

Zum PCR-Produkt wurden 10 Units vom Restriktionsenzym *DpnI* gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur die Template-Vektor-DNA, weil diese durch Minipräparation (siehe 2.10.9.4) aus *E. coli*-Zellen gewonnen wurde und methyliert war. *DpnI* schneidet nur, wenn die Restriktionsschnittstelle eine Dam-Methylierung aufweist. Im Gegensatz dazu war das PCR-Produkt nicht Dam-methyliert. 5 µl amplifizierte Vektor-DNA wurden zu 50 µl kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen (siehe Tabelle 2) gegeben und es wurde eine Transformation durchgeführt (siehe 2.10.11). Die entstandenen Bakterienkolonien wurden gemäß 2.10.12.2 untersucht und es wurde eine Kontrollsequenzierung durchgeführt.

2.10.15.2. pPICZB- und pPICZαA-Vektoren

In die pPICZB- und pPICZαA-Vektoren (siehe Tabelle 4) wurde zur Linearisierung des Plasmids eine zusätzliche *NdeI*-Schnittstelle eingefügt (siehe 3.7.4.2). Dazu wurden die Primer SD-for-NdeIpiczmut und SD-rev-NdeIpiczmut entworfen (siehe Tabelle 52) und mit der *Pfu*-DNA-Polymerase und mit Vektor-DNA (ca. 30 ng) als Template eine PCR durchgeführt. Dabei kam das gleiche PCR-Programm wie bei der Mutation des pET28a-Vektors (siehe 2.10.15.1) zum Einsatz, jedoch mit einer auf 7 min verkürzten Elongationszeit und nur 17 statt 18 PCR-Zyklen. Zur Transformation wurden 10 µl *DpnI*-

geschnittenes PCR-Produkt in kompetente *E. coli* XL-1Blue-Zellen transformiert (siehe 2.10.11) und auf LSLB-Platten mit 25 µg/ml Zeocin® (siehe 2.5 und 2.4.1) aufgetragen.

2.10.16. Hefe - *Pichia pastoris*

2.10.16.1. Vorbereitung eines Plasmids zur Transformation in *P. pastoris*

Nachdem eine zu untersuchende DNA in den Hefevektor pPICZB und pPICZαA (siehe Tabelle 4) kloniert worden war, musste dieser Plasmid für eine homologe Rekombination ins Genom der *P. pastoris*-Zellen linearisiert werden. Als erstes wurde der Vektor mit Insert-DNA in hoher Konzentration durch Midi-Präparation aus *E. coli* TOP10-Zellen gewonnen (siehe 2.10.9.3). Von dieser Plasmid-DNA wurden 10 µg mit dem Restriktionsenzym *PmeI* über Nacht bei 37°C geschnitten.

DNA (10 µg)	x µl
Restriktionsenzym <i>PmeI</i> (10 U)	1 µl
10x Reaktionspuffer NEB 4	3-25 µl
BSA (100 µg/ml)	0,3-2,5 µl
Wasser	ad 30-250 µl

Das Ergebnis der Restriktion wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (siehe 2.10.5) überprüft und nach vollständiger Linearisierung des Vektors wurde das Restriktionsenzym bei 65°C für 20 min inaktiviert. Das linearisierte Plasmid wurde nach einer Auftrennung im Agarosegel mit dem Nucleo-Spin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel) gereinigt (siehe 2.10.9.1) und nach einer Gehaltsbestimmung durch eine Ethanolfällung (siehe 2.10.2.2 und 2.10.13) aufkonzentriert. Eine andere Möglichkeit zur Konzentrierung (ca. 1 µg/µl) war eine Agarosegelreinigung mit Hilfe des QIAEXII-Kits (Qiagen) (siehe 2.10.9.1).

2.10.16.2. Kompetente Zellen und Transformation

Zur Transformation von Hefezellen können enzymatisch-chemische Methoden oder eine Elektroporation angewendet werden. Hefezellen besitzen eine Zellwand aus Polyglycan, die für eine Transformation entfernt werden muss. Dazu kann eine Lyticase- oder Zymolyasebehandlung verwendet werden. Es entsteht ein Protoplast, der dann mit Calciumchlorid transformiert werden kann. Diese enzymatische Methode ist nicht froststabil und bei *P. pastoris* auf Grund der Zeocin®-Resistenz nicht zu empfehlen. Alternativen sind die LiCl- oder PEG-Transformationsmethode. Nachteil ist, dass die Transformationseffizienz deutlich schlechter ist. Die höchste Effizienz besitzt die Elektroporation.

Elektroporation

Eine Methode zur Transformation von Hefezellen ist die Elektroporation. Zum Testen dieser Methode wurde das Gerät EquiBio-Elektroporator EasyjecT Prima (PEQLAB Biotechnologie GmbH) verwendet, das dem Institut für kurze Zeit freundlicherweise zur Verfügung stand.

Eine einzelne Kolonie von einem frischen Ausstrich eines *P. pastoris*-Stammes wurde in 25 ml YPD-Medium (siehe 2.6) über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3 bis 1,5 angezogen (siehe 2.10.10). Die Suspension wurde bei 4°C und 2000 rpm für 5 min in der Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (Rotor GH 3.8) pelletiert. Das Pellet wurde in 25 ml sterilem eisgekühlten Wasser resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Dann wurde der Waschschrift mit 12,5 ml eisgekühltem Wasser wiederholt, das Pellet in 2,5 ml 1 M Sorbitol (eisgekühlt, steril) resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 125 µl 1 M Sorbitol (eisgekühlt, steril) resuspendiert und bis zur Transformation auf Eis gelagert. Die Zellen können nicht bei -80°C eingefroren werden. 80 µl kompetente Zellen wurden mit 5-10 µg linearisierter Plasmid-DNA (in maximal 10 µl Wasser gelöst) in einer eisgekühlten, sterilen Elektroporationsküvette (2 mm gap) gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde mit dem Gerät gepulst (5 msec, 1800 V). Zum Reaktionsansatz wurde sofort 1 ml eisgekühltes, steriles 1 M Sorbitol gegeben. Diese Suspension wurde in ein steriles Gefäß überführt und für ein bis zwei Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf YPDS-Platten mit Zeocin® aufgetragen. Diese Platten wurden für 2-7 Tage im Dunkeln bei 30°C inkubiert (siehe 2.6).

PEG-1000-Methode

Bei der PEG-1000-Methode (Polyethylenglykol) nach Dohmen et al. [1991] werden Hefezellen durch Ethylenglykol kompetent gemacht.

Von einem frischen Ausstrich eines *P. pastoris*-Stammes wurde eine Kolonie in 10 ml YPD-Medium (siehe 2.6) über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 angezogen (siehe 2.10.10). Die folgenden Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die Zellen wurden bei 3000 rpm in der Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (Rotor GH 3.8) für 5 min zentrifugiert und das Pellet mit 5 ml Lösung I gewaschen. Die Suspension wurde mit 2000 rpm für 2 min zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml Lösung I resuspendiert. Die Zellen wurden in Portionen à 50 µl abgefüllt, je 4 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Gefrierschutzmittel) dazugeben und gemischt. Die kompetenten Hefezellen wurden bei -80°C gelagert.

Einzelstrang-Carrier-DNA (UltraPure™ Herring Sperm DNA-Solution, 10 mg/ml, Invitrogen) wurde in kochendem Wasser für 5 min denaturiert und dann für 5 min auf Eis abgekühlt. 50 µg (5 µl) Heringssperma-DNA und bis zu 5 µg linearisierte Plasmid-DNA wurden auf die 50 µl nicht aufgetauten, kompetenten Hefezellen gegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert und alle 10 Sekunden durch Vortexen gemischt bis die Suspension zu tauen anfangt, dann wurde der Inkubationsansatz vollständig durch Vortexen aufgetaut. Es wurden 700 µl Lösung II zugeben und 1 min gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 30°C inkubiert und alle 15 min gemischt. Die *P. pastoris*-Zellen wurden bei 6000 rpm für 1 min abgetrennt, in 500 µl Lösung III resuspendiert und auf YPDS-Platten mit Zeocin® ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C im Dunkeln für 3 bis 4 Tage inkubiert (siehe 2.6).

Lösung I

1 M Sorbitol	91,09 g
Ethylenglykol	3% (v/v)
10 mM Bicine	12,5 ml Bicine-Stammlösung
Wasser	ad 500 ml

Lösung II

PEG 1000	40%
(Polyethylenglykol 1000)	
gelöst in Bicine-Stammlösung	

Lösung III

0,15 M NaCl	0,88 g
10 mM Bicine	5 ml Bicine-Stammlösung
Wasser	ad 100 ml

200 mM Bicine-Stammlösung

Bicine	6,52 g
Wasser	ad 200 ml
pH-Wert 8,35 (NaOH)	

EasyComp™-Methode

Das Pichia EasyComp™ Kit (Invitrogen) ist eine schnelle Methode zur Transformation von Hefezellen. Mit dem Kit stellt man chemisch kompetente *P. pastoris* Zellen her.

Eine Kolonie eines *Pichia pastoris*-Ausstrichs wurde in 10 ml YPD-Medium über Nacht bei 30°C unter Schütteln kultiviert (siehe 2.6). Die Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 mit YPD verdünnt und weiter kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 erreicht wurde (siehe 2.10.10). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 2300 rpm für 5 min geerntet, in 10 ml Solution I (Kit) resuspendiert und wieder für 5 min bei 2300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Solution I (Kit) resuspendiert und in 50 µl Portionen abgefüllt, in Filterpapier gewickelt und bei -80°C eingefroren. Das Einwickeln der Proben bewirkte ein langsames Abkühlen und damit einen schonenderen Einfriervorgang.

Ein 50 µl Aliquot der kompetenten Hefezellen wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 3 µg linearisierte Plasmid-DNA (höhere Mengen steigern die Ausbeute) versetzt, wobei das Volumen der zugesetzten DNA 5 µl nicht überschreiten sollte. Zur DNA-Zell-Suspension wurden 1 ml Solution II (Kit) gegeben, geschüttelt und für eine Stunde bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Dabei wurden die Zellen alle 15 min gemischt, um so ein Absetzen der Zellen zu verhindern und die Transformationseffizienz zu steigern. Die Reaktionsmischung wurde für 10 min in einem Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach dem Aufteilen des Ansatzes auf zwei Gefäße wurde zu jedem Gefäß 1 ml YPD-Medium gegeben. Damit sich die Zeocin®-Resistenz durch Expression des Resistenzgens ausbilden konnte, wurden die Hefezellen für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5700 rpm (Raumtemperatur) wurde jedes Pellet mit 500 µl Solution III (Kit) gewaschen. Die Suspensionen wurden vereinigt und bei 5700 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Solution III (Kit) aufgenommen und auf YPDS-Platten mit Zeocin® aufgetragen. Für zwei bis vier Tage wurden die Platten im Dunkeln bei 30°C inkubiert (siehe 2.6).

2.10.16.3. Identifikation von positiven Klonen

Eine Isolation von genomischer DNA aus transformierten Hefezellen kann auf verschiedene Arten erfolgen (siehe auch 3.7.4.1).

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktionsmethode (Handmethode)

Genomische DNA wurde aus *P. pastoris*-Zellen durch die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktionsmethode nach Sambrook et al. [1989] isoliert. Dazu wurden *P. pastoris*-Klone in 15 ml YPD-Medium mit Zeocin® über Nacht unter Schütteln bei 30°C angezogen (siehe 2.6). Die Zellen wurden bei 2200 rpm und 4°C für 5 min in der Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (Rotor GH 3.8) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl sterilem Wasser gewaschen, bei 2200 rpm für 5 min zentrifugiert und in 200 µl Detergenz-Puffer suspendiert. Zum Zerstören der Zellwände wurden 0,3 g steriler Quarzsand und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1; (v/v/v)) zur Suspension gegeben und 3 min kräftig geschüttelt. Es wurden 200 µl TE-Puffer (10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8) zugefügt und kurz gemischt. Für 5 min wurde die Suspension bei 15000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Fällern von DNA wurde 1 ml 100% Ethanol zugegeben, durch Schwenken vorsichtig gemischt, kurz auf Eis gekühlt und bei 15000 rpm bei 4°C für 13 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer gelöst und die vorhandene RNA durch Inkubation bei 37°C für 5 min mit Hilfe von 3 µl DNase-freie RNase A (10 mg/ml, Roth) zerstört. Zum abgekühlten Ansatz wurden 40 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH-Wert 5,2) und 1 ml 100% Ethanol gegeben, um die DNA zu fällen. Die Lösung wurde für kurze Zeit auf Eis gekühlt und anschließend für 30 min bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet, in 100 µl 10 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8) aufgenommen und eine Gehaltsbestimmung durchgeführt (siehe 2.10.2.2). 40 ng isolierte genomische DNA wurden als Template für ein PCR-Screening eingesetzt (siehe 2.10.4.4).

Detergenz-Puffer

SDS	1%
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	2%
TRIS/HCl	10 mM
pH-Wert 8,0; autoklaviert.	

DNeasy® Tissue Kit

Eine andere Methode zur Isolierung von genomischer DNA aus *P. pastoris*-Zellen ist das DNeasy® Tissue Kit (Qiagen). Hier wurde eine *P. pastoris*-Kolonie in YPD- oder YPG-Medium über Nacht bei 30°C unter Schütteln angezogen (siehe 2.6) und 10 ml wurden dann bei 3800 rpm (Beckmann-Zentrifuge-Ausschwingrotor GH 3.8) bei Raumtemperatur für 10 min geerntet. Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte anschließend nach Herstellervorschrift mit dem DNeasy® Tissue Kit. Die genomische DNA wurde mit zweimal 200 µl Wasser oder zweimal 200 µl AE-Buffer (Kit) von der Säulenmembran eluiert. Der Gehalt der isolierten genomischen DNA wurde bestimmt (siehe 2.10.2.2) und 40 ng für ein PCR-Screening eingesetzt (siehe 2.10.4.4).

Direkt-PCR-Screening

Nach einer modifizierten Methode nach Linder et al. [1996] und Li et al. [2001] wurden Hefekolonien auf eine Integration eines Plasmids ins Genom der Hefe überprüft.

Eine *P. pastoris*-Kolonie wurde gepickt, in 20 µl sterilem Wasser in einer Mikrotiterplatte resuspendiert und 10 µl dieser Suspension wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben. Diese wurde mit 10 µl einer Lyticaselösung (0,01 U, Sigma) versetzt, für 10 min bei 30°C inkubiert, anschließend bei –80°C für 10 min eingefroren und wieder aufgetaut. Diese Proben wurden mit 25 µl Wasser verdünnt und dann direkt für eine PCR eingesetzt (siehe 2.10.4.4).

2.11. Lokalisation von Proteinen über Signalpeptide

Mit Hilfe von fluoreszierenden Proteinen als Sonde lassen sich Zellorganelle lokalisieren, zu denen eine Signalpeptidsequenz ein Protein in lebenden Zellen transportiert. Dazu werden Pflanzenteile mit Goldpartikeln beschossen, die zuvor mit DNA beschichtet wurden, um transgene Pflanzen zu erzeugen. Die Beschichtung der Partikel bestand bei den hier durchgeführten Experimenten aus einem Plasmid, das aus dem pBSK-GFP-N-Fus-Vektor (siehe Tabelle 5) sowie der zu untersuchenden cDNA-Signalpeptidsequenz zusammengesetzt war (siehe 3.11). Dabei wurde die Signalpeptidsequenz, deren Lokalisation untersucht werden sollte, vor das 5'-Ende der Sequenz eines Green-Fluorescent-Proteins (GFP) einer Qualle (*Aequorea victoria*) kloniert. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des CaMV-35S Promotors (Cauliflower Mosaic Virus). Eine GFP-Expression konnte durch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar gemacht werden.

2.11.1. Herstellung der cDNA-Konstrukte

Mit Expressionsprimern (siehe Tabelle 55 in Kapitel 3.11), die die Signalpeptidsequenz einschließlich der ersten ca. 500 bp am 5'-Ende der cDNA amplifizieren und die Restriktionsschnittstellen *Bsa*I und *Bgl*II besitzen, wurde eine PCR mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase (Invitrogen) in einem 50 µl Ansatz durchgeführt (siehe 2.10.4.3). Der PCR-Ansatz wurde durch eine Agarosegelreinigung bzw. direkte Säulenreinigung aufgereinigt (siehe 2.10.9). Dann wurden nacheinander die Restriktionen mit *Bsa*I und *Bgl*II mit dem Amplifikat sowie mit *Nco*I und *Bgl*II mit dem pBSK-GFP-N-Fus-Vektor ausgeführt (siehe 2.10.7). Nach der Ligation fand eine Transformation in *E. coli* DH5α- oder XL1-Blue-Zellen statt (siehe 2.10.11). Das Plasmid wurde vermehrt, aus *E. coli* isoliert und gereinigt (siehe 2.10.9). Nach einer Gehaltbestimmung (siehe 2.10.2.2) wurde die gereinigte DNA-Lösung unter Luftstrom eingengt und mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Im Anschluss fand eine Kontrollsequenzierung der Plasmide mit dem „Primer 35S“ (siehe Tabelle 8) statt.

2.11.2. DNA-Beschichtung der Goldpartikel

Eine Beschichtung von Goldpartikeln erfolgte nach Bauer [2004]. Zur Beschichtung wurden 3 mg Goldpartikel (1 μm gold microcarrier, Bio-Rad Laboratories) in 100 μl 70% Ethanol (v/v) für 20 sec suspendiert, so dass die Partikel homogen verteilt waren. Die Suspension wurde für genau eine Minute auf Eis gekühlt und dann für eine Minute mit 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 μl Wasser resuspendiert, eine Minute stehengelassen und dann für 15 sec bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Goldpellet wurde in 50 μl 50% Glycerol (v/v) aufgenommen, gemischt, bis die Partikel in Suspension waren und für 10 sec mit Ultraschall behandelt. Die Goldpartikelsuspension wurde auf Eis gestellt, 4 bis 7 μl cDNA (entsprachen 4 bis 7 μg cDNA) zugefügt, mit einer Pipette gemischt und wieder für fünf Minuten auf Eis gestellt. Es wurden 50 μl 2,5 M Calciumchloridlösung zugefügt, sehr vorsichtig gemischt, nach einer Minute wurde 20 μl kalte 1 M Spermidinlösung zugefügt und wieder sehr vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde er für 15 sec bei 500 rpm zentrifugiert und das Pellet durch sehr vorsichtiges Mischen in 100 μl 70% Ethanol resuspendiert. Die Suspension wurde ein weiteres Mal für 15 sec bei 500 rpm zentrifugiert und das Pellet dieses Mal durch leichtes Mischen in 50 μl 100% Ethanol resuspendiert. Das Pellet wurde ein zweites Mal zentrifugiert, in 35 μl 100% Ethanol aufgenommen und anschließend für 2 bis 3 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Es wurden 5 μl Goldsuspension pro „Macrocarrier“/„Flying Disc“ (Bio-Rad, Makroträger: Scheibe aus Kunststoff) unter sterilen Bedingungen aufgetragen und vollständig getrocknet.

2.11.3. Partikelkanone

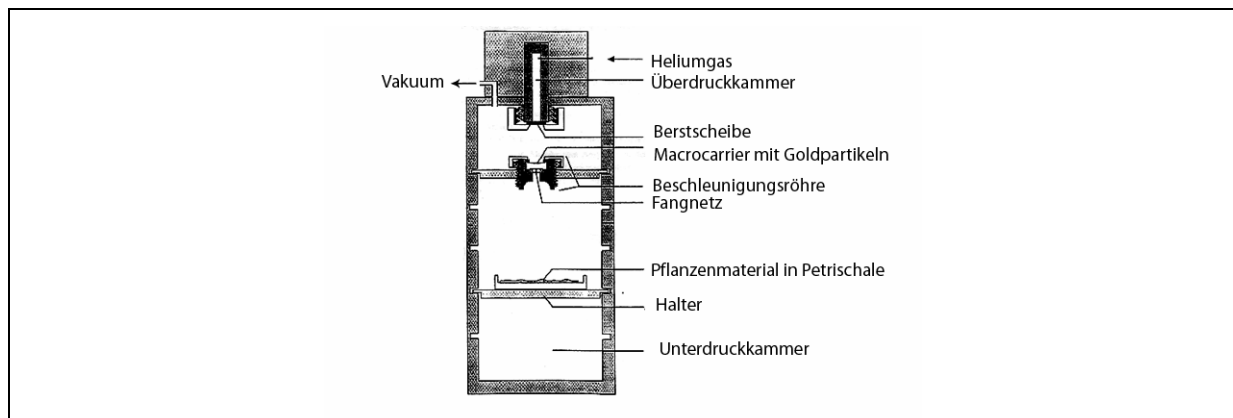


Abbildung 8: Partikelkanone (Skizze)

Zum Beschuss von Pflanzenteilen wurde eine Heliumkanone (BIOLISTICS Particle Delivery System PDS-1000, Bio-Rad) verwendet (siehe Skizze in Abbildung 8). Die beladenen Macrocarrier (siehe 2.11.2) und ein Fangnetz wurden in die Beschleunigungsröhre eingelegt, in der Halterung festgeschraubt und in die Unterdruckkammer eingeschoben. Oberhalb davon wurde eine Berstscheibe in der Kanone festgeschraubt. Es wurden runde Blattscheiben (\varnothing 3 cm) aus jungen Blättern von *Nicotiana tabacum* L. cv. Gatersleben (Gewächshaus), möglichst ohne Mittelrippe mit einem Metallausstanzter ausgestanzt und mit der Blattunterseite nach oben auf befeuchtetes Filterpapier in

Petrischalen gelegt. *Senecio vernalis*-Blätter wurden als Ganzes mit der Blattunterseite nach oben auf 2% Agar in Petrischalen mit Hilfe von Heftklammern befestigt. Die Schalen wurden in die Unterdruckkammer der Partikelkanone gestellt, in der dann ein Vakuum von ca. 200 mbar angelegt wurde. Anschließend wurde in die Überdruckkammer Helium eingeleitet bis die Berstscheibe platzte und der konstante Druck auf den Macrocarrier abgegeben wurde. Dieser stieß an das Fangnetz und wurde abgebremst. Die beladenen Goldpartikel wurden vom Macrocarrier abgelöst und flogen mit hoher Geschwindigkeit durch das Netz auf die Pflanzenzellen. Sie trafen auf das Pflanzenmaterial, drangen durch die Zellwand ins Zellinnere, und dort löste sich die cDNA ab. Es wurde mit einem Druck von 350, 700 und 900 psi und einem Abstand von 45 und 75 mm zwischen dem Pflanzenmaterial und dem Macrocarrier beschossen. Als Beschichtung wurden der leere pBSK-GFP-N-Fus-Vektor als Kontrolle und die drei cDNA-Konstrukte von *Senecio vernalis* verwendet. Beschossen wurden Tabakblätter sowie *S. vernalis*-Blätter. Die Blattstücke wurden für 2 bis 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei trat transiente Genexpression auf. Das bedeutet, dass Fremd-DNA nicht ins Genom integriert, aber in der Zelle für einige Zeit exprimiert wurde. Diese Expression konnte durch Nachweis des Green-Fluorescent-Proteins (GFP) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektiert und dokumentiert werden.

2.11.4. Mikroskopische Analyse

Die mit einer Partikelkanone transformierten Zellen (siehe 2.11.3) wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop CLSM-510META Axioskop Mikroskop (Carl Zeiss) und der CLSM510 META Software analysiert. Ein Argonlaser regte die Green-Fluorescent-Protein-Fluoreszenz bei 488 nm an und die Lichtemission wurde bei 515-520 nm detektiert. Um eine Autofluoreszenz durch das Chlorophyll auszuschließen, wurden Emissionsspektren in zwei Kanälen 505-550 nm und 665-719 nm aufgenommen.

Die Beschichtung der Goldpartikel, der Partikelbeschuss sowie die mikroskopische Analyse fanden in dem Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig unter der freundlichen Leitung und Hilfe von Herrn Dr. Robert Hänsch und Frau Dr. Katharina Nowak statt.

2.12. Proteinchemische Methoden

2.12.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Trennung von komplexen Proteingemischen eingesetzt. Mit ihr können Proteine identifiziert, gereinigt und Molekulargewichte von Proteinuntereinheiten mit Hilfe von Proteinstandards abgeschätzt werden. Das Gel wird aus einem Copolymerisat aus den Monomeren Acrylamid (AA) und *N,N'*-Methylen-bis-Acrylamid (BIS) erhalten. Weiterhin wird Natriumdodecylsulfat (SDS) als ein anionisches Detergenz zugesetzt, um die Eigenladung der Proteine zu überdecken und Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit zu erzeugen. Als Starter der Polymerisation dienen Ammoniumpersulfat (APS) und *N,N,N',N'*-

Tetramethylenethyldiamin (TEMED). Für die Versuchsdurchführungen wurde ein diskontinuierliches Puffersystem [Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989] in einer Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad) mit dem Pharmacia LKB MultiDrive XL (Pharmacia) als Spannungsgeber verwendet. Die Mini-PROTEAN®-Kammer wurde mit 1X SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach dem Gießen von Trenn- und Sammelgel wurden Proteinproben mit 2xProbenpuffer 1 + 1 verdünnt (v/v), für 5 min bei 95°C denaturiert und in die Probentaschen eingefüllt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 3 µl einer 10-kDa-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese fand in 1X SDS-Elektrodenpuffer bei konstanter Spannung von 200 V für ungefähr 45 min statt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach der Trennung wurden die Proteinbanden im Trenngel durch Coomassie-Blau-Färbung (siehe 2.12.3.1) angefärbt.

verwendete 10-kDa-Leitern:

PageRuler™ Protein Ladder (Fermentas)
 PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas)
 Broad Range Protein Marker (Promega)
 10 kDa Protein Ladder (Life Technologies)

	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
Wasser	4,00 ml	3,35 ml	6,10 ml
1,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 8,8)	2,70 ml	2,70 ml	-
10% SDS (w/v)	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Acrylamidlösung	3,35 ml	4,00 ml	1,30 ml
0,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 6,8)	-	-	2,50 ml
10%APS (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	50 µl	50 µl	50 µl

Es wurden erhöhte Mengen an TEMED eingesetzt, um die Polymerisation zu beschleunigen.

Acrylamidlösung: Rotiphorese Gel 30 (Roth)	Verhältnis
Acrylamid	30% (w/v)
BisAcrylamid	0,8% (w/v)

2xProbenpuffer		10X SDS-Elektrodenpuffer	
Wasser	2,70 ml	TRIS Base	30 g
0,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 6,8)	1,00 ml	Glycin	144 g
Glycerin	2,00 ml	SDS	10 g
10% SDS (w/v)	3,30 ml	Wasser	ad 1000 ml
β-Mercaptoethanol	0,50 ml	1X SDS-Elektrodenpuffer: 10X SDS-	
Bromphenolblau 0,5% (w/v)	0,50 ml	Elektrodenpuffer mit Wasser 1:10 verdünnt.	

2.12.2. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (native PAGE)

Bei der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese ist kein SDS enthalten, um die zu trennenden Proteine in ihrer nativen Konformation zu erhalten. Die Trennung erfolgt durch die Ladung der Proteine nach deren isoelektrischen Punkt und dem pH-Wert des verwendeten Puffers. Vorteil ist hier, dass Enzyme

ihre Aktivität behalten und im Anschluss aufgrund ihrer biochemischen Aktivität im Gel direkt nachweisbar sind.

Eine Elektrophorese-Apparatur wurde mit 1X nativem Elektrophoresepuffer und die mit 2x nativen Probenpuffer 1 + 1 (v/v) verdünnten Proben wurden in die Probentaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte unter gleichen Bedingungen wie die SDS-PAGE (siehe 2.12.1) jedoch unter Kühlung mit Eis, um die enzymatische Aktivität der zu trennenden Enzyme zu erhalten. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden Aktivitätsfärbungen durchgeführt (siehe 2.15.4).

2x nativer Probenpuffer		10X nativer Elektrophoresepuffer	
Wasser	6,5 ml	TRIS	6 g
0,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 6,8)	1,00 ml	Glycin	28,8 g
Glycerin	2,00 ml	Wasser	ad 1000 ml
Bromphenolblau 0,5% (w/v)	0,50 ml	1X nativer Elektrophoresepuffer: 10X nativer Elektrophoresepuffer mit Wasser 1:10 verdünnt.	

	Trenngel (7%)	Sammelgel (4%)
Wasser	4,85 ml	6,20 ml
1,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 8,8)	2,70 ml	
Acrylamidlösung	2,50 ml	1,30 ml
0,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 6,8)		2,50 ml
10% APS (w/v)	100 µl	100 µl
TEMED	50 µl	50 µl

2.12.3. Färbungen von SDS-PAGE-Gelen oder Blot-Membranen

Nach einer Auftrennung von Proteinen (siehe 2.12.1) war es notwendig, die Proteinbanden im Gel oder auf einer Membran (siehe 2.12.14.2) durch Färbungen sichtbar zu machen. Vor oder während des Färbens wurden die Proteine im Gel mit Alkohol-Essigsäure-Wasser-Mischungen, die das Färbereagenz enthalten, fixiert, d. h. denaturiert und ausgefällt.

2.12.3.1. Coomassie-Blau-Färbung

Coomassie-Brilliant-Blau bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Die Nachweisgrenze beträgt ca. 1 µg pro Bande. Ein wiederholtes Färben und Entfärben des Gels ist möglich. Gele wurden für eine Stunde (Membranen: 5 bis 10 min) in der Färbelösung unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde für je 30 min in Entfärber I und Entfärber II entfärbt. Die blaugefärbten Proteinbanden wurden mit Hilfe des MultiImageTM Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) dokumentiert.

Coomassie-Blau-Stammlösung		Färbelösung	
Coomassie-Brilliant-Blau R250 (Serva-Blau R)	1 g	Coomassie-Blau-Stammlösung	25 ml
Wasser	ad 100 ml	Methanol	100 ml
gerührt und filtriert.		Eisessig	20 ml

	Entfärber I	Entfärber II
Methanol	500 ml	50 ml
Eisessig	100 ml	70 ml
Wasser	ad 1000 ml	ad 1000 ml

2.12.3.2. Indian Ink-Färbung

Mit der Indian-Ink-Färbe-Methode können 1 bis 10 ng Protein auf Membranen detektiert werden. Sie diente als Standardmethode zur Überprüfung, ob ein Proteintransfer während des Blottens stattgefunden hat [Hancock und Tsang, 1983].

Eine Blot-Membran wurde kurz in 1X PBS gewaschen (siehe 2.12.14.1), bevor frisch hergestellte Indian-Ink-Färbelösung auf die Membran gegeben wurde. Für eine Stunde wurde unter Schütteln gefärbt. Die Membran wurde mit Wasser gespült und anschließend an der Luft getrocknet.

Indian-Ink-Färbelösung

Indian Ink (Fount India, Pelikan)	100 µl
Eisessig	1 ml
1X PBS-T (siehe 2.12.14.3)	100 ml

2.12.3.3. Ponceau-Orange-Färbung

Bei Proben mit größeren Proteinmengen ist die Ponceau-Färbung eine Methode zur Färbung von Membranen. Die Nachweisgrenze liegt bei 250-500 ng und die Färbung ist reversibel. Ponceau ist ein positiv geladener Farbstoff und bindet an Proteine auf einer Membran, die dann als rosa-rote Banden sichtbar werden. Eine Membran wurde 5 min in Ponceau-Färbelösung geschüttelt, anschließend wurde der überschüssige Farbstoff mit Wasser entfernt.

Ponceau-Orange-Färbelösung

Ponceau S	0,1 g
Eisessig	5 ml
Wasser	ad 100 ml

2.12.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Kationische sowie nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinmolekülen bilden im sauren Milieu mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm besitzen [Bradford, 1976].

Es wurden Kalibrierkurven mit einer 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung (Serva) erstellt. Mit dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen von 200 µg/ml bis 1000 µg/ml angesetzt. Zu 1 ml Bradford-Reagenz wurden 20 µl Probe gegeben. Dabei wurden die Proteinproben unverdünnt oder mit Wasser verdünnt eingesetzt. Als Blindwert diente 20 µl Wasser. Nach zwei Minuten war die Farbentwicklung beendet und die Absorption der Standards sowie der Proben wurde gegen den Wasserblindwert bei 595 nm in Kunststoffküvetten (d=1cm) am Photometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences) gemessen.

Bradford-Schnelltest (qualitativer Proteinnachweis)

In Mikrotiterplatten wurden 100 µl Bradford-Reagenz sowie 2 µl Probe gegeben. Eine Blaufärbung zeigte Protein an.

Bradford Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg	in
Ethanol	50 ml	gelöst
Phosphorsäure 85%	100 ml	zugegeben
Wasser	ad 1000 ml	evtl. filtriert.

2.12.5. Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen

2.12.5.1. Konzentrierung

Zur Konzentrierung von größeren Volumina (≥ 20 ml) wurde die Ultrafiltrationsanlage ProVario-3 (FILTRON) mit der Ultrasette als Tangentialfilter (Ausschlussgrenze: 30 kDa) verwendet. Mit einem Gegendruck von ca. 0,5 bar und einer Pumprate von 250 ml/min wurde eine Lösung bis auf ein Volumen von ≥ 10 ml aufkonzentriert. Zum Reinigen wurde die Anlage erst mit Wasser, dann mit 0,5 M Natriumchloridlösung gespült und nach Durchpumpen von 0,05% Natriumazidlösung gelagert.

Für kleinere Volumina (2,5 bis 20 ml) wurden die Zentrifugalfilter Amicon® Ultra-4 (Millipore) und Vivaspin 6 (Vivascience) verwendet. Die vertikalen Membranen besitzen eine Ausschlussgrenze von 30 kDa und wurden bei maximal 3800 rpm mit der Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (Rotor GS 3.8) zentrifugiert. Das kleinste erzielbare Probenvolumen betrug 50 µl.

Die Vivaspin 500 µl Ultrafiltrationssäulen (Vivascience) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa wurden zur Konzentrierung von Proteinlösungen mit einem Volumen $\leq 2,5$ ml verwendet.

Bei Rohextraktproben, die für längere Zeit gelagert werden sollten, bot sich eine Gefriertrocknung an. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage ALPHA (Christ) bei 0,01 mbar Vakuum und -20°C bis zur Trockene eingengt. Die Proben wurden anschließend bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.12.5.2. Umpuffern und Entsalzen von Lösungen mit PD10-Säulen

Um Proteinlösungen umzupuffern oder zu entsalzen wurden PD-10 Desalting Columns (Amersham Biosciences) verwendet. Diese wurden mit 30 ml Puffer äquilibriert, dann wurden 2,5 ml Probelösung aufgetragen und Proteine mit 3,5 ml Puffer eluiert. Bei Probe-Volumina $< 2,5$ ml wurde erst die Probe aufgetragen. Nach dem Einziehen wurde soviel Puffer aufgetragen, dass aufgetragene Probe und aufgetragener Puffer (x ml) zusammen ein Volumen von 2,5 ml ergaben. Die Proteine wurden anschließend mit Puffer (Volumen = $3,5 \text{ ml} - x \text{ ml}$) eluiert. Die PD10-Säulen wurden mit 5 ml 0,1 M Natronlauge gereinigt, danach mit 0,5 M Natriumchloridlösung neutral gewaschen und bei 4°C gelagert.

2.12.6. Trichloressigsäure-Proteinfällung

Durch Trichloressigsäure fallen fast alle Proteine aus [Bennett, 1967]. Diese Fällung ist irreversibel, d. h. ein Protein liegt nach der Fällung denaturiert vor. Dies ist eine einfache und quantitative Fällungsmethode, wenn Proben mit geringen Proteinkonzentrationen z. B. durch eine SDS-Gelelektrophorese analysiert werden sollen.

Zum Probevolumen wurden 1/10 Probevolumen 55% Trichloressigsäure (TCA) und 1/10 Probevolumen 0,1% Natrium-Desoxycholat (DOC, in 0,05% Natriumazidlösung gelöst) gegeben, gemischt und zur Fällung je nach Volumen für 10 min bis über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die Suspension wurde für 30 min bei 15300 rpm und bei 4°C (Sigma Laborzentrifuge, 1K15) zentrifugiert und das Pellet in 1,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 8,8) suspendiert. Die Proben wurden für eine SDS-PAGE (siehe 2.12.1) bzw. einem Western-Blot (siehe 2.12.14) verwendet.

2.12.7. Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterialien

Zur Herstellung von Rohextrakten aus Pflanzenmaterialien wurden Pflanzenteile mit Wasser gespült und mit einem Papier trockengetupft. Mit flüssigem Stickstoff wurden die Pflanzenteile schockgefroren und durch Mörsern fein zerkleinert. Es wurden Polyclar® AT (Menge: 20% des Gewichts des eingesetzten Pflanzenmaterials) zur Bindung von Gerbstoffen und 3 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH-Wert 7,0; 2 mM DTT (Gerbu)) pro Gramm Pflanzenmaterial zugegeben. Unter Eiskühlung wurde die Suspension zur Extraktion von Proteinen für mindestens 15 min gerührt und anschließend wurde die Proben für 15 min in der Sorvall® RC-5B Zentrifuge (Du Pont Instruments) mit dem SS34 Rotor bei 26900xg zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Der Rohextrakt wurde direkt eingesetzt oder vorher über PD10-Säulen umgepuffert (siehe 2.12.5).

2.12.8. Proteinrohextrakte aus *E. coli*

Eine Zellwand von Bakterienzellen besteht aus einer alternierenden Folge von *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure. Zur Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*-Zellen muss diese Zellwand zerstört werden. Dazu sind mechanische oder enzymatische Methoden möglich.

2.12.8.1. Ultraschallbehandlung

Nach einer Expression (siehe 2.12.10.1) wurden Bakterienzellen durch Zentrifugation geerntet und bei -80°C eingefroren oder direkt weiter behandelt. Das Pellet wurde in 3 ml Puffer (pro 50 ml Kultur) resuspendiert. Unter Eiskühlung erfolgte ein Zellaufschluss durch Ultraschall für 8 min mit dem Branson Sonifier 250 (Micro Tip Limit: 1-2; Duty Cycle: 30-50%). Die Suspension wurde bei 4°C für 10 min in der Sorvall® RC-5B Zentrifuge (Du Pont Instruments) mit dem SS34 Rotor bei 26900xg zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt eingesetzt oder nach Umpufferung mit PD10-Säulen (siehe 2.12.5) verwendet.

2.12.8.2. Lysozym-Aufschluss

Geerntete, bei -80°C eingefrorene Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und in 1,5 ml Puffer pro 50 ml Expressionskultur resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 15 μl Lysozym-Lösung (75 mg/ml, Roth) gegeben, gemischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Während der Inkubation wurde der Ansatz zwei bis drei Mal stark durchmischt. Im Anschluss wurde nach 15 min Zentrifugation (Sorvall® RC-5B Zentrifuge bei 26900xg, SS34 Rotor) der Überstand weiterverwendet.

2.12.8.3. Kombinationsaufschluss bei Inclusion-bodies

Die Methode nach Ott [1996] wurde modifiziert. Geerntete Bakterienzellen wurden in 5 ml 1X Waschpuffer pro 50 ml LB-Kultur resuspendiert (siehe 2.12.11). Zu dieser Bakteriensuspension wurden 50 bis 500 μl Lysozym-Lösung (100 mg/ml, Roth) gegeben, gemischt und für 30 min bei 30°C unter gelegentlichem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Nach der enzymatischen Reaktion wurden die Zellen mit Ultraschall (siehe 2.12.8.1) unter Eiskühlung für 8 min behandelt. Der Ansatz wurde dann bei 4°C für 10 min (Sorvall® RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor) bei 26900xg zentrifugiert. Das Pellet sowie der Überstand wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert (siehe 2.12.11).

2.12.9. Affinitätsreinigung von Proteinen über Nickel-NTA-Agarose

Sequenzen, die am C-Terminus oder am N-Terminus einen His-Tag (bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidinresten) besitzen, können nach einer Expression in Bakterienzellen oder in Hefezellen mit Hilfe einer Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt werden [Porath et al., 1975; Hochuli et al., 1987]. Für diese Affinitätschromatographie wird als Komplexligand Nitriltriessigsäure (NTA) verwendet, die an Sepharose® CL-6B gekoppelt ist. Dieser hat sechs Bindungsstellen. Vier werden von einem Nickelion besetzt und die restlichen zwei können eine Bindung mit den Imidazolringen des Histidin-Tags des Proteins eingehen. Durch Zugabe von Imidazol im Überschuss kann das Protein von diesem Komplex gelöst werden. Bei Verwendung der Nickel-NTA-Agarose erfolgte eine Reinigung unter nativen oder denaturierenden Bedingungen.

2.12.9.1. Native His-Tagreinigung

Eine Proteinlösung mit rekombinanten His-Tag-Proteinen wurde mit PD10-Säulen (Amersham Biosciences) auf den Lysispuffer umgepuffert (siehe 2.12.8 und 2.12.5.2). In leere PD10-Hülsen mit Fritte wurde Nickel-NTA-Agarose-Suspension (Invitrogen) gegeben und mit Lysispuffer äquilibriert. Dieses Material wurde zu der umgepufferten Proteinlösung gegeben (200 μl Nickel-NTA-Agarose-Suspension pro aufgearbeiteter 50 ml LB-Kultur). Für eine Stunde fand eine Kopplung an die Matrix bei 4°C mit einem End-Over-End-Schüttler statt. Die folgenden Wasch- und Elutionsschritte erfolgten bei 4°C . Der Durchlauf wurde aufgefangen, die Agarose wurde mit viermal 1 ml Waschpuffer sowie einmal 1 ml Lysispuffer gewaschen und zum Schluss erfolgte eine Elution der Proteine mit fünfmal 0,5 ml Elutionspuffer. Mit Hilfe eines Bradford-Schnelltest (siehe 2.12.4) sowie mit einer SDS-PAGE

(siehe 2.12.1) wurden die Fraktionen auf Protein untersucht. Die positiv getesteten Elutionsfraktionen wurden vereinigt.

	Lysispuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
NaH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	1,5 M	300 mM
Imidazol	20 mM	50 mM	250 mM
alle pH-Wert 8,0			

2.12.9.2. Denaturierende His-Tag-Reinigung

Es wurden 500 µl Nickel-NTA-Agarose-Suspension (Invitrogen) in eine leere PD10-Hülse mit Fritte gegeben und mit denaturierendem Lysispuffer äquilibriert. Die Agarosesuspension wurde zur umgepufferten Proteinlösung (500 µl Nickel-NTA-Agarose-Suspension pro aufgearbeiteter 50 ml LB-Kultur) (siehe 2.12.5.2) pipettiert und für eine Stunde mit einem End-Over-End-Schüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Waschen und die Elution erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie die native His-Tag-Reinigung (siehe 2.12.9.1). Nur wurde zusätzlich mit zweimal 2 ml denaturierendem Waschpuffer gewaschen. Zur Verbesserung der Bindungsbedingungen und der Elutionsbedingungen wurde der pH-Wert des denaturierenden Lysis- und Elutionspuffers variiert (siehe 3.7.3.1).

	denaturierender Lysispuffer	denaturierender Waschpuffer	denaturierender Elutionspuffer
NaH ₂ PO ₄	100 mM	100 mM	100 mM
TRIS/HCl	10 mM	10 mM	10 mM
Harnstoff	8 M	8 M	8 M
	pH-Wert 8,0	pH-Wert 6,3	pH-Wert 5,9
	pH-Wert-Variation 7,5-9,0		pH-Wert 4,5

2.12.9.3. TALON®-Metallchelate-Affinitäts-Reinigung (BD Biosciences)

Eine Alternative zur Nickel-NTA-Agarose-Reinigung von rekombinanten Proteinen mit einem His-Tag ist die Reinigung mit TALON®-Metal Affinity Resins (BD Biosciences). TALON® ist ein spezieller Metallkomplexbilder mit acht Bindungsstellen. Sechs Liganden sind mit einem Kobaltion besetzt. Die anderen zwei sind Bindungsstellen für den Polyhistidin-Tag des Proteins. Diese Bindung ist gemäß Herstellerangaben selektiver als die Bindung an Ni-NTA-Agarose, d. h. es werden weniger Fremdproteine gebunden.

Es wurden 200 µl TALON®-Materialsuspension mit 10-20 Säulenvolumen W/E-Puffer äquilibriert. Nach Umpuffern eines Rohextraktes mit rekombinanten His-Tag-Proteinen (siehe 2.12.5) auf den W/E-Puffer wurde zu den 3,5 ml PD10-Eluat die äquilibrierte TALON®-Materialsuspension gegeben. Diese Suspension wurde in einem 15 ml Falcontube bei 4°C für 60 min mit einem End-Over-End-Schüttler an die Matrix gekoppelt. In einer Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (GH 3.8 Rotor) wurde das TALON®-Material vom Überstand mit 3800 rpm unter Kühlung für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend mit einer Pipette, ohne die Matrix aufzuwirbeln, abgenommen. Es

wurde 1 ml W/E-Puffer zugefügt, die Suspension für 10 min mit einem End-Over-End-Schüttler gemischt und anschließend die Waschlösung durch Zentrifugation für 5 min bei 3800 rpm abgetrennt. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Das TALON®-Material wurde in 500 µl W/E-Puffer resuspendiert, auf eine Fritte in einer leeren PD10-Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Die Proteine wurden durch Elution mit fünfmal 0,5 ml E-Puffer von der Matrix eluiert.

	W/E-Puffer	E-Puffer
NaH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM
Imidazol	-	150 mM
	alle pH-Wert 7,0	

Mit einem Bradfordschnelltest sowie einer SDS-PAGE wurden die Fraktionen qualitativ auf Proteine getestet (siehe 2.12.4 und 2.12.1).

2.12.10. *E. coli*-Expressionssystem

Das *E. coli*-T7-Expressionssystem verwendet einen T7-Promotor und eine T7-RNA-Polymerase [Studier und Moffatt, 1986; Studier, 1991]. Wenn transformierte *E. coli*-Zellen sich im nicht induzierten Zustand befinden, bindet der *lac*-Repressor an den *lac*-Operator und die Expression der T7-RNA-Polymerase durch den *lac*-Promotor wird unterdrückt. Die *E. coli*-RNA-Polymerase kann nicht am *lac*-Promotor binden und das T7-RNA-Polymerasegen wird nicht abgelesen. IPTG (Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid) induziert die Expression der T7-RNA-Polymerase, in dem es an den *lac*-Repressor bindet, dessen Konformation ändert, so dass der *lac*-Repressor nicht mehr am Promotor binden kann. Die T7-RNA-Polymerase-Synthese erfolgt. Der transformierte Expressionsvektor besitzt einen T7-Promotor, an dem die T7-RNA-Polymerase bindet. Die Fremd-DNA wird dann abgelesen.

E. coli BL21pLysE-Zellen besitzen ein zusätzliches Plasmid, das das T7-Lysozym-Gen codiert. Das abgelesene Lysozym kann die T7-RNA-Polymerase inaktivieren und dadurch wird die immer in *E. coli* vorhandene schwache Hintergrundexpression unterdrückt.

2.12.10.1. Induktionsbedingungen

Nach einer Transformation eines Plasmids mit der Sequenz des zu exprimierenden Proteins in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (siehe 2.10.11) wurden Klone von einer LB-Platte gepickt und in 5 ml LB-flüssig-Medium mit Antibiotikum über Nacht unter Schütteln bei 37°C angezogen (siehe 2.4.1). Von dieser Übernachtskultur (Vorkultur) wurden 1,5 ml zu einer LB-Hauptkultur mit Antibiotikum gegeben. Bei Ampicillin-Zusatz wurden 1,5 ml Vorkultur geerntet, das Pellet in frischem LB-Medium resuspendiert und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur wurde bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen. Dann wurde 0,5 M IPTG (Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid) in einer Endkonzentration von 0,01 bis 1 mM und Kupfer(II)-Ionen (Endkonzentration: 0-150 µM) zur Unterstützung der TPQ-Bildung zugefügt (siehe 3.7). Die Zellen wurden für weitere vier Stunden oder länger bei 16°C, 25°C oder 37°C unter Schütteln inkubiert.

Standard-Induktionsbedingungen waren 4 h bei 37°C mit 0,5 mM IPTG-Zusatz. Die *E. coli*-Zellen wurden in der Beckmann-Ausschwingrotorzentrifuge (Rotor GH 3.8) bei Raumtemperatur und 3800 rpm für 10 min geerntet. Das Pellet wurde entweder sofort weiter untersucht (siehe 2.12.8) oder bei –80°C gelagert. Die Expression wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE überprüft (siehe 2.12.1).

<u>Kupfersulfatstammlösung</u>	<u>IPTG-Stammlösung</u>
10 mg/ml CuSO ₄ ·5H ₂ O [\equiv 40 mM Cu ²⁺]	0,5 M

2.12.11. Solubilisierung von Inclusion-bodies (IBs)

Bei einer Expression in *E. coli*-Zellen wurden häufig die rekombinanten Proteine in Form von unlöslichen, inaktiven Aggregaten bzw. Einschlusskörpern, den Inclusion-bodies (IBs) in den Zellen gelagert. Das Protein lag nur teilweise oder falsch gefaltet vor, so dass eine *in vitro*-Faltung entwickelt werden musste, um die Aggregate in eine aktive Konformation zurück zu bringen. Dazu mussten die Proteine aus den Einschlusskörpern vollständig solubilisiert und anschließend renaturiert werden. Für eine Solubilisierung werden meist ionische Detergenzien und Denaturierungsmittel wie z. B. 6 M Guanidin/HCl oder 8 M Harnstoff verwendet. Nach der Solubilisierung fand entweder nach Umpufferung eine His-Tag-Reinigung (siehe 2.12.5 und 2.12.9) oder eine direkte Rückfaltung der IBs durch eine Dialyse statt (siehe 2.12.12).

2.12.11.1. Solubilisierung von IBs mit Natriumglycinat

Die Isolierung und Solubilisierung der IBs erfolgte durch eine Methode nach dem „Protein Refolding Kit“ (Novagen), die leicht modifiziert wurde.

Nach einer Induktion mit IPTG und Kupfer(II)-Ionen (siehe 2.12.10.1) wurde das erhaltene Pellet einer 50 ml LB-flüssig-Kultur in 3 ml 1X Waschpuffer resuspendiert. Nach Zellaufschluss (siehe 2.12.8) wurde die Suspension (Sorvall® RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor) bei 26900xg zentrifugiert bis ein klarer Überstand vorhanden war. Das Pellet wurde mit 3 ml 1X Waschpuffer gewaschen und erneut bei 26900xg für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Das Pellet wurde möglichst vollständig vom Puffer befreit und das Feuchtgewicht der IBs bestimmt. Zur Solubilisierung wurden 1X Solubilisierungspuffer mit *N*-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (Fluka) als Detergenz und DTT (Gerbü) verwendet. Es wurden 1 ml 1X Solubilisierungspuffer pro 10 mg Proteinefeuchtgewicht eingesetzt. In einem Falcontube wurden die IBs für ca. 3 h bei 4°C mit einem End-Over-End-Schüttler solubilisiert, d. h. eine klare Lösung war entstanden (siehe 3.7.3, 3.7.3.1, 3.7.3.2 und 3.7.3.3).

<u>10X Waschpuffer</u>	<u>10X Solubilisierungspuffer</u>
TRIS/HCl	Natriumglycinat
200 mM	1 M
Na-EDTA	pH-Wert 11
100 mM	
Triton X-100	
10% (v/v)	
pH-Wert 7,5	

1X Waschpuffer sowie 1X Solubilisierungspuffer: 1:10 mit Wasser verdünnte 10X Puffer.

2.12.11.2. Solubilisierung von IBs mit Harnstoff

Bei einer Solubilisierung von IBs nach Jung et al. [2003] wurden geerntete *E. coli*-Zellen einer Expressionskultur (siehe 2.12.10.1) in 3 ml 1X Waschpuffer mit 0,1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Proteasehemmer) und 4 µl Lysozym-Lösung (75 mg/ml, Roth) resuspendiert. Nach Zellaufschluss durch Ultraschall (siehe 2.12.8.1) wurde das Lysat bei 26900xg (Sorvall® RC-5B Zentrifuge, Rotor SS34) für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml Waschpuffer A gewaschen und bei 26900xg für 15 min zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. Das IB-Pellet wurde mit 3 ml Solubilisierungspuffer A versetzt und über Nacht bei 4°C mit einem End-Over-End-Schüttler solubilisiert, so dass eine klare Lösung entstanden war. Falls noch ungelöste Bestandteile vorhanden waren, wurden diese durch Zentrifugation bei 4°C abgetrennt.

10X Waschpuffer

TRIS/HCl	200 mM
Na-EDTA	100 mM
Triton X-100	10% (v/v)
pH-Wert 7,5	

1x Waschpuffer: 10X Waschpuffer mit Wasser 1:10 verdünnt.

	Waschpuffer A	Solubilisierungspuffer A
Harnstoff	2 M	8 M
K ₂ HPO ₄	10 mM	10 mM
β-Mercaptoethanol	-	3 mM
	alle pH-Wert 8,2	

2.12.12. Renaturierung von IBs

Solubilierte IBs (siehe 2.12.11) sollten nun in ihre aktive Konformation gebracht werden. Eine Möglichkeit hierfür war die Dialyse. Der Solubilisierungspuffer wurde dazu gegen einen Faltungspuffer ausgetauscht, in dem sich dann langsam die aktive Konformation der rekombinanten Proteine bildete.

2.12.12.1. Dialyse

Die Solubilisierungslösung (siehe 2.12.11) wurde in einen abgekühlten Dialyseschlauch gefüllt und in 500 ml 1X Dialysepuffer ohne DTT mit 10 µM Cu(II)-Ionen und 12 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) unter Rühren bei 4°C dialysiert. Nach drei Stunden wurde der Puffer gegen 500 ml neuen 1X Dialysepuffer ausgetauscht und über Nacht dialysiert. Nach insgesamt 24 Stunden Dialyse wurde der Dialysepuffer (500 ml 1X Dialysepuffer mit 0,1 mM DTT, 10 µM Cu(II)-Ionen und 12 µM PMSF) erneuert. Dieser Vorgang wurde alle 24 Stunden wiederholt. Es wurde nach Umpufferung und Konzentrierung auf Aktivität der rekombinanten Proteine überprüft (siehe 2.15).

50X Dialysepuffer

TRIS/HCl	1 M
pH-Wert 8,5	

1X Dialysepuffer: 50X Dialysepuffer mit Wasser 1:50 verdünnt.

Vorbehandlung des Dialyseschlauchs

Der Dialyseschlauch (Dialysis Tubing-Visking Size 6-27/32'', Mediceil international LTD oder Visking-Dialyseschlauch Typ 36/32, Serva) wurde für 10 min in Wasser aufgekocht. Das Wasser wurde gewechselt und der Vorgang wiederholt.

2.12.12.2. *In vitro*-Refolding mit Chaperonen (Helferproteine)

Die Methode nach Quyen [1999] wurde modifiziert. Zur Unterstützung einer Faltung von rekombinanten Proteinen in eine aktive Konformation wurden in einen Dialyseschlauch bakterielle Helferproteine (siehe 3.7.2.1) zugesetzt, die in getrennter Kultur wie folgt exprimiert wurden. Von einem Ausstrich von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die das Plasmid pRDKJG (siehe Tabelle 5) enthielten, wurde eine Bakterienkolonie unter Standardbedingungen exprimiert (siehe 2.12.10.1 und 2.4). Dieses Plasmid codiert das Chaperon DnaK (69 kDa) und die Co-Chaperone DnaJ (41 kDa) und GrpE (24 kDa). Eine Isolierung der Chaperone fand gemäß 2.12.8.1 statt. Nach Proteinbestimmung (siehe 2.12.4) wurden vom Chaperon-Rohextrakt ~ 120-160 µg/ml Gesamtprotein nach insgesamt 24 Stunden Dialyse gleichzeitig mit dem dritten Pufferwechsel in den Dialyseschlauch gegeben (siehe 3.7.3.3).

2.12.13. Expressionssystem - *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ist eine methylotrophe Hefe, die in der Lage ist Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verstoffwechseln. Es entsteht durch eine Alkoholoxidase aus Methanol Formaldehyd und Wasserstoffperoxid. Durch Induktion mit Methanol wird das rekombinante Protein in den Hefen exprimiert. Der KM71H-Stamm (siehe Tabelle 3) wächst langsam auf Methanol, da das *AOX1*-Gen zerstört und nur das *AOX2*-Gen funktionell vorhanden ist (siehe 2.5).

2.12.13.1. Induktionsbedingungen für KM71H *Pichia pastoris*-Klone

Es wurde ein Ausstrich eines transformierten *Pichia pastoris*-Klons des KM71H-Stamms auf einer YPD-Platte mit Zeocin® zur Selektion sowie als Kontrolle ein Ausstrich des KM71H-Hefestammes auf einer YPD-Platte ohne Zeocin® angefertigt und inkubiert (siehe 2.6). Von diesen wurde je eine Hefekolonie gepickt und über Nacht unter Schütteln in YPG-Medium in Schikanekolben bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 angezogen (ca. 16-18 h). Um für eine gute Durchlüftung zu sorgen, wurden die Schikanekolben nur zu einem 1/10tel bis 1/5tel ihres Volumens mit Medium gefüllt. Die Zellen wurden mit der Sorvall® RC-5B Zentrifuge bei 4000xg für 10 min bei Raumtemperatur geerntet. Das Zellpellet wurde in BMMY-Medium (siehe 2.6) mit einem 1/10 des Ausgangskulturvolumens resuspendiert. Die Schikanekolben waren mit sterilen Gaseabdeckungen bedeckt, um so eine gute Belüftung der Kultur zu gewährleisten. Die Expressionskulturen wurden bei 30°C unter Schütteln kultiviert und alle 24 Stunden wurde 0,5-2% Methanol zugesetzt. Zur Überprüfung der Expression wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für eine SDS-PAGE (siehe 2.12.1) gezogen. Dazu

wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand sowie das Zellpellet untersucht (siehe 2.12.13.2 und 2.12.13.3).

2.12.13.2. Schnelle Hefe-Protein-Präparation für SDS-PAGE

Nach einer Methode von Horvath und Riezman [1994] wurden *P. pastoris*-Proben (Volumen < 1,5 ml) für eine SDS-PAGE geerntet, mit Wasser gewaschen und in 100 µl Hefe-SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und anzentrifugiert, bevor der Überstand mit einer SDS-PAGE (siehe 2.12.1) aufgetrennt wurde.

Hefe-SDS-Probenpuffer

Glycerol	10%	(v/v)
SDS	2%	
2-Mercaptoethanol	5%	(v/v)
Bromphenol-Blau	0,0025%	
in 0,06 M TRIS/HCl (pH-Wert 6,8) gelöst.		

2.12.13.3. Methoden zum Hefezellenaufschluss

Eine Hefezellwand unterscheidet sich im Aufbau von einer Bakterienzellwand. Außen befindet sich eine Phospholipidmembran gefolgt von mehreren Schichten aus Polysacchariden, die aus Mycolsäure, Arabinogalactan und Peptidoglycan bestehen. Diese Zellwand lässt sich nicht so einfach wie die von Bakterien (z. B. *E. coli*) aufschließen und erfordert daher andere Methoden, wie enzymatische oder mechanische. Ein Zellaufbruch von *P. pastoris*-Zellen wurde durch Mikroskopie überprüft. Falls der Zellaufbruch nicht vollständig war, wurde die angewendete Methode wiederholt. Die Hefezellen (siehe 2.12.13.1) wurden durch Zentrifugation bei 4°C geerntet.

Breaking-Puffer

Natriumphosphat (Monobasisch)	50 mM
Glycerol	5%
pH-Wert 7,4 (NaOH)	
1 mM PMSF (Proteasehemmer) vor Gebrauch zugegeben.	

Glass beads

Zum Zellpellet von kleinen Probevolumina (< 1,5 ml) der Hefekulturen wurden 100 µl Breaking-Puffer gegeben, das Volumen mit einem Strich auf dem Eppendorfgefäß markiert, mit „acid-washed“ Glass Beads (s. u.) bis zur Markierung aufgefüllt und resuspendiert.

Bei größeren Probevolumina (> 1,5 ml) wurden 3 ml Breaking-Puffer zum Pellet in Falcontubes gegeben, resuspendiert und für 5 min bei 4°C und 2000 rpm (Beckmann-Zentrifuge, Rotor GH 3.8) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 3 ml Breaking-Puffer resuspendiert und ca. 2 g „acid-washed“ Glass Beads (s. u.) zugefügt.

Die Proben wurden 30 sec stark gemischt und dann für 30 sec auf Eis gekühlt. Dieser Vorgang wurde insgesamt achtmal ausgeführt. Dann wurde der Zellbruch mit den Glassperlen vom Überstand durch Zentrifugation bei 4°C für 10 min abgetrennt. Die Überstandsproben wurden durch eine TCA-Fällung

aufkonzentriert (siehe 2.12.6) und auf Expression mit einer SDS-PAGE (siehe 2.12.1) untersucht. Bei größeren Probemengen erfolgte nach Umpufferung und Konzentrierung ein Aktivitätstest (siehe 2.12.5 und 2.15).

Pendelhubstichsäge (Modell T.I.P. PST S570, Praktiker Baumarkt)

Das Pellet wurde mit Breaking-Puffer (1 + 1) versetzt und resuspendiert. Es wurden 2-5 g „acid-washed“ Glass Beads (s. u.) zugefügt. Mit einer Stichsäge wurde für 30 sec mit 3000 Bewegungen pro Minute geschüttelt und dann wurde das Gefäß für 30 sec auf Eis abgekühlt. Diese Aufschlussmethode wurde für insgesamt 20 min durchgeführt. Die aufgeschlossenen Hefezellen wurden mit der Sorvall® RC-5B Zentrifuge bei 26900xg (SS34 Rotor) für 15 min unter Kühlung bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde weiter verwendet.

Die „Pendelhubstichsägen-Methode“ wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. U. Matern am Institut für Pharmazeutische Biologie, Marburg (Deutschland) entwickelt und freundlicher Weise durch Herrn Dr. Stefan Martens zur Verfügung gestellt.

Sonifier mit Glassperlen

Eine weitere Möglichkeit des Hefezellaufschlusses ist ein Ultraschallaufschluss in Kombination mit Glassperlen. Dabei werden die Glasperlen durch den Ultraschall aneinander gerieben und unterstützen so den Zellaufschluss.

Zum *P. pastoris*-Zellpellet einer 20 ml Expressionskultur wurden 3 ml Breaking-Puffer gegeben. Die „acid-washed“ Glass Beads (s. u.) wurden im Mengenverhältnis 1 Teil Glasperlen zu 2 Teilen Puffer zugesetzt. Dann fand unter Eiswasserkühlung der Hefeaufschluss mit dem Branson Sonifier 250 (Micro Tip Limit: 3; Duty Cycle: 10%) für 10 min statt. Die Glasperlen-Hefesuspension wurde in der Sorvall® RC-5B Zentrifuge bei 26900xg für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Ein Nachteil dieser Aufschlussmethode war, dass durch die Reibung der Perlen die Sonifier-Spitze starke Erosionserscheinungen zeigte.

„Acid-washed Glass Beads“

Ungewaschene Glasperlen (100 g, 425 microns, Sigma) wurden mit 100 ml 5 M Salzsäure unter Rühren in einem Becherglas 30 min gewaschen. Dabei wurde die Säure dreimal ausgetauscht. Anschließend wurden die Glass Beads mit einer Absaugapparatur mit Wasser neutral gewaschen. Die Perlen wurden im Trockenschrank bei 37°C getrocknet.

„Hefe-Nudeln“

Beim Zellaufschluss nach Schultz [1999] wurde das Hefezellpellet erst mit Wasser und dann mit Breaking-Puffer gewaschen. Das entstandene Pellet wurde anschließend mit 5 ml Breaking-Puffer (0,2 mM DTT und 10 µl 0,1 M PMSF-Proteasehemmer) resuspendiert und für 10 min bei 4000xg in der Sorvall® RC-5B Zentrifuge (GSA Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt. Das Pellet wurde in eine Kunststoffeinwegspritze eingefüllt und in flüssigem Stickstoff

gedrückt, so dass „Nudeln“ entstanden. Dabei war es wichtig, dass das Pellet eine recht trockene Konsistenz besaß und nicht zu flüssig war, denn sonst entstanden statt „Nudeln“ „Perlen“. Die Nudeln wurden bei -80°C eingefroren und gelagert. Zur Extraktion von Proteinen wurden die Hefenudeln in flüssigem Stickstoff in einem Mörser mit Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Nach Auftauen des Pulvers wurden 2 ml Breaking-Puffer mit Proteasehemmern (siehe Tabelle 9) pro Gramm Hefenudeln zugefügt. Ohne Blasenbildung wurde das Pulver mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze durch Rühren sowie Auf-und-Ab-Pipettieren vorsichtig gemischt bis eine homogene Suspension entstanden war. Dabei wurde ein Erwärmen vermieden. Anschließend wurde mit 15000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für weitere Versuche eingesetzt.

Proteasehemmstoffe	Stammlösung	Endkonzentration
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	100 mM (in Isopropanol) 500X	0,2 mM
Benzamidin/HCl	1 M 100X	10 mM
TPCK (L-1-Chloro-3-(4-tosylamido)-4-phenyl-2-butanon)	3 mg/mL (in Ethanol) 120X	25 µg/ml
Leupeptin	1 mg/ml 200X	5 µg/ml
Pepstatin	1 mg/ml (in Methanol) 286X	3,5 µg/ml
Aprotinin	2 mg/ml (in 0,9% NaCl) 200X	10 µg/ml

Tabelle 9: Proteasehemmer-Cocktail nach Schultz [1999].

French Press

Ein Hochdruckzellaufschluss wurde mit der French[®]Press von der Firma Polytec (Leihgabe) durchgeführt, die als Vorführgerät aber nur kurzzeitig für die Arbeiten zur Verfügung stand. Die Aufschlusszelle 40 K mit 35 ml Fassungsvermögen sowie der Schnellfüllstand wurden bei 4°C vorgekühlt. Das *P. pastoris*-Zellpellet wurde mit der doppelten Menge an Zellvolumen mit nativem His-Tag-Reinigungs-Lysispuffer mit Proteasehemmer-Cocktail (siehe Tabelle 9) versetzt, resuspendiert und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in die Aufschlusszelle der French[®]Press mit dem Schnellfüllstand gefüllt. Nach Anlegen von 2000 psi (40000 bar) wurde das Auslassventil geöffnet und mit 10-50 Tropfen pro Minute das Zelllysate unter Eiskühlung aufgefangen. Der Vorgang des Hochdruckaufschlusses wurde wiederholt. Die Zellen wurden bei 4°C für 30 min mit der Sorvall[®] RC-5B Zentrifuge bei 26900xg (SS34 Rotor) zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

2.12.14. Western-Blot

Zur Bestimmung eines Ortes und Stärke einer Expression bestimmter Proteine in verschiedenen Pflanzenteilen wurden Western-Blots durchgeführt. Eine Detektion erfolgte durch spezifische Antikörper gegen das zu untersuchende Protein.

2.12.14.1. Extraktion des löslichen Gesamtproteins

Pflanzenproben (ca. 200-800 mg) wurden in flüssigem Stickstoff durch Mörsern fein zerkleinert und mit 1,5 ml 1X PBS-Puffer (mit 2,5% Polyclar® AT und 2,5% Natriumascorbat) versetzt. Diese Mischung wurde in einem Eisbad für 30 min gerührt. Polyclar® AT wurde zugesetzt, um enthaltene Gerbstoffe zu binden. Das Antioxidationsmittel Natriumascorbat diente dazu, die Quervernetzung von Polyphenolen durch Polyphenoloxidasen zu verhindern. Die Suspension wurde für 30 min bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Von einem Aliquot wurde zuvor eine Proteingehaltsbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe 2.12.4). Jeweils 20 µg lösliches Protein wurden gefällt (siehe 2.12.6), das Pellet in 10 µl 1,5 M TRIS/HCl (pH-Wert 8,8) suspendiert und mit 10 µl 2xProbenpuffer versetzt (siehe 2.12.1).

10X PBS (autoklaviert)

NaCl	80 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Wasser	ad 1000 ml
pH-Wert 7,2	

1x PBS: 10x PBS mit Wasser 1:10 verdünnt.

2.12.14.2. Blotten

Blotten ist der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran. Mit Proteinproben (siehe 2.12.14.1) wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.12.1) durchgeführt. Nach dem Äquilibrieren einer Membran und vier Whatman-Papieren (Größe 6x9 cm) mit 1X Blotpuffer wurde der Blot luftblasenfrei und feucht aufgebaut. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid - Immobilon P, Millipore) oder Nitrocellulose-Membran (Hybond™-C Extra, Amersham LIFE SCIENCE) erfolgte mit der Multiphor II Nova Blot electrophoretic transfer Unit (Pharmacia) und dem Spannungsgeber der MultiDrive XL (Pharmacia) im „semi-dry“-Verfahren.

Anode (+-Pol)
 2X Whatman-Papier
Membran
SDS-Gel
 2X Whatman-Papier
Kathode (--Pol)

Der Proteintransfer erfolgte eine Stunde bei ansteigender Spannung. Bei zwei Gelen betrug die Stromstärke 160 mA und bei einem Gel 120 mA.

10X Blotpuffer

TRIS Base	58 g
Glycin	29 g
SDS	3,7 g
Wasser	ad 1000 ml

1X Blotpuffer

10X Blotpuffer	10 ml
Methanol	20 ml
Wasser	ad 100 ml

Nach dem Blotten wurde das zu untersuchende Protein über eine Immunodetektion visualisiert (siehe 2.12.14.3) oder es wurde für einen Chinonnachweis eine Redox-Färbung durchgeführt (siehe 2.12.15).

2.12.14.3. Immunodetektion

An das zu untersuchende Protein wurde nach dem Membrantransfer (siehe 2.12.14.2) ein spezifischer primärer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein gebunden. Dieser wurde aus einem Kaninchen gewonnen und durch Affinitätschromatographie gereinigt. An diesen primären Antikörper wurde ein sekundärer Antikörper gebunden, der spezifisch gegen Kaninchenproteine ist. Die Detektion des Western-Blots erfolgte letztendlich über eine Lichtemission. Eine Meerrettich-Peroxidase, die am sekundären Antikörper gekoppelt war, katalysierte eine Oxidation von Luminol. Luminol wurde in einen angeregten Zustand überführt. Wenn das Molekül in den Grundzustand zurückfiel, wurde Energie in Form von Licht frei und diese Energie konnte mit Röntgenfilmen detektiert werden.

Nach dem Abbau des Blots wurde die Transferseite der Membran markiert. Um die freien, unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran für eine Stunde auf einem Schüttler mit 5% Milchpulver in 1X TBS-T-Lösung behandelt. Zur Bindung des primären Antikörpers wurde der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper ($OD_{280} > 0,8$) in 5% Milch-TBS-T-Lösung 1:10000 verdünnt und die Membran für eine Stunde unter ständigem Schütteln inkubiert. Zum Waschen der Membran wurde diese für dreimal sieben Minuten in 1X TBS-T-Lösung geschwenkt. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:333 in 1X TBS-T eingesetzt. Es handelte sich um einen Goat-Anti-Rabbit-Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase (Dianova) gekoppelt ist. Die Membran wurde für eine Stunde in dieser Lösung inkubiert. Dreimal wurde die Blot-Membran für sieben Minuten in 1X TBS-T-Lösung und einmal für fünf Minuten in 1X PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Minute in einer Mischung aus 1 ml „Detection Reagent1“ und 1 ml „Detection Reagent2“ aus dem „ECL Western blotting detection reagents and analysis system“ (Amersham Biosciences) inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Emittiertes Licht wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT, XAR-5, Kodak) für 15-150 sec detektiert. Der Film wurde mit „RP X-OMAT developer/replenisher“ (Kodak) entwickelt und mit „RP X-OMAT L0 fixer/replenisher“ (Kodak) fixiert. Anschließend wurde die Membran zur Überprüfung des Proteintransfers mit Indian Ink gefärbt (siehe 2.12.3.2).

10X TBS

NaCl	80 g
TRIS Base	30 g
KCl	2 g
Wasser	ad 1000 ml
pH-Wert	8

1X TBS-T

10X TBS	50 ml
Tween20	0,5 g
Wasser	ad 500 ml

2.12.15. Nachweis von Chinonproteinen durch Redox-Staining

Im alkalischen Milieu und in Gegenwart von Glycin werden Chinone oxidiert. Dieses Verhalten kann zum Nachweis von Chinonproteinen genutzt werden [Paz et al., 1991; Cai und Klinman, 1994b]. Das farblose Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) wird zu einem wasserunlöslichen roten Farbstoff (1,3,5-Triphenylformazan) reduziert. Bei weiterer Reduktion entsteht ein blauschwarzer Diformazan-Farbstoff.

Proteinlösungen wurden mit TCA-Fällung gefällt (siehe 2.12.6) und anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe 2.12.1). Dann wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran oder PVDF-Membran geblottet (siehe 2.12.14.2). Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bis über Nacht bei ansteigender Spannung.

Blotpuffer für Redox-Staining		NBT-Glycinatlösung	
TRIS Base	25 mM	NBT	0,24 mM
Glycin	192 mM	Kaliumglycinat	2 M oder 0,1 M
Methanol	20% (v/v)	pH-Wert 10	
pH-Wert 8,3			

Chinonproteine auf der Membran wurden durch eine NBT-Färbung sichtbar gemacht. Die Membran wurde in einer NBT-Glycinatlösung im Dunkeln für 45 min inkubiert. Die Chinonproteine waren blauschwarz gefärbt. Die Membran konnte in einer 0,1 M Natriumboratlösung (pH-Wert 10) bei 4°C gelagert werden.

2.13. Gewebereinbettung

2.13.1. Technovit 7100 für die Lichtmikroskopie

Zur Immunolokalisation von Proteinen in einem Gewebe mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung wurden Wurzeln von *S. vernalis* und *S. jacobaea* in den kaltpolymerisierenden Kunststoff Technovit 7100 eingebettet. Die Immunomarkierung wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop untersucht.

2.13.1.1. Fixierung

Pflanzenproben wurden mit Wasser von ihrem Substrat gereinigt und trockengetupft. Junge Wurzeln wurden in etwa 1 cm lange Segmente geschnitten. Zur Fixierung von Zellinhalten und Antigenen im Gewebe wurde eine Fixierlösung aus Formaldehyd verwendet. Die Proben wurden in die Fixierlösung gegeben und unter Eiskühlung für eine Stunde fixiert. Damit die Luft aus den Zellen entweichen kann und zur Infiltration des Gewebes, wurde ein Unterdruck von -0,3 bar angelegt. Danach wurde die Fixierlösung ausgetauscht und die Vakuumbehandlung wiederholt.

Fixierlösung

4 g Paraformaldehyd wurden in 40 ml Wasser auf 50°C erhitzt. Dann wurde 5 M Natronlauge zugefügt bis eine klare Lösung entstanden war. Nach dem Abkühlen wurden 10 ml 10X PBS-Lösung

(siehe 2.12.14.1) pH-Wert 7,5 zugefügt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Zum Schluss wurden 100 µl Triton X-100 zugegeben.

2.13.1.2. Entwässerung

Die Fixierlösung wurde abgegossen und es folgte ein fünfminütiger Waschschriff mit 1X PBS (siehe 2.12.14.1). Zur Entwässerung der Gewebe wurde eine aufsteigende Ethanolreihe angewendet. Die Proben wurden für je 30 min bei Raumtemperatur mit 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Ethanol (v/v) entwässert. Der letzte Schritt wurde für 60 min wiederholt.

2.13.1.3. Einbettung in Technovit 7100 (HeraeusKulzer)

Die Wurzelproben wurden zunächst für eine Stunde in Technovit-Lösung (Ethanol + Technovit 7100: 1+1 (v/v)) und danach eine weitere Stunde in reinem Technovit 7100 inkubiert. In 10 ml Technovit 7100 wurden 100 mg Härter I unter Rühren gelöst. Diese Kunststoff-HärterI-Lösung wurde zu den Wurzelproben gegeben und diese über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine neue Kunststoff-HärterI-Lösung angesetzt und zusätzlich 666 µl HärterII zu gefügt, der die Polymerisation startete. Der Kunststoff wurde in Formen (PCR-Tubes) gegossen und die Wurzeln darin ausgerichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Proben mit Technovit 3040 überschichtet. Die eingebetteten Gewebeproben wurden in einem Exsikkator gelagert.

2.13.1.4. Schneiden der Gewebelöckchen

Nach dem Auspolymerisieren wurden die Kunststoffblöcke mit einer Rasierklinge in Pyramidenform getrimmt. Die Proben wurden mit dem Rotationsmikrotom HM 355 S (Micron) mit Hilfe von Histoknife H Einweg-Mikrotommessern (Haraeus Kulzer) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 4 µm und die Schnitte wurden auf Objektträger SuperFrost[®]/Plus (Menzel-Gläser) aufgezogen. Die Schnitte konnten bei 4°C gelagert werden. Mit den Pflanzenschnitten wurde eine Immunmarkierung durchgeführt (siehe 2.13.1.5).

2.13.1.5. Immunmarkierung – Fluoreszenzmarkierung

Zur Markierung der exprimierten Proteine im Gewebe wurde erst ein primärer Antikörper, der aus einem Kaninchen stammt und spezifisch an dem zu untersuchenden Protein bindet, verwendet. Dann wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und spezifisch an Proteine bindet, die aus Kaninchen gewonnen wurden. Wenn dieser mit UV-Licht angeregt wurde, emittierte er Fluoreszenz-Licht bestimmter Wellenlänge, die durch ein Epifluoreszenzmikroskop detektiert und betrachtet werden konnte.

Um freies Formaldehyd zu binden und unspezifische Bindungen im Gewebe abzusättigen, wurden die Schnitte auf den Objektträgern für 15 min bei 37°C erst mit einer 50 mM NH₄Cl-Lösung, dann mit einer 50 mM Glycin-Lösung und zum Schluss mit einer 10% BSA-Lösung (mit 0,1% Fischgelatine (v/v) in 1X PBS) inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal 5 min mit 1X PBS (siehe 2.12.14.1) unter Schütteln gewaschen. Der primäre polyklonale Antikörper (OO₂₈₀ > 0,8) wurde 1:50 verdünnt (1X

PBS) und für 4 Stunden auf den Schnitten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Schnitte wieder dreimal 5 min mit 1X PBS unter Schütteln gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung durch den sekundären Goat-Anti-Rabbit-Antikörper konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Anti-Rabbit IgG-FITC antibody produced in goat, Sigma) in einer 1:100 Verdünnung (1X PBS). Die Schnitte wurden im Dunkeln für eine Stunde bei 37°C inkubiert und dreimal mit 1X PBS für je 10 min gewaschen. Die markierten Schnitte wurden mit Mounting-Medium (Citiflour, Agar Scientific) vor Ausbleichen unter UV-Licht geschützt und mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus (Filtersatz09, BP 450-490, FT 510, LP 515, Zeiss) ausgewertet.

2.13.2. Paraplast® X-tra für Laser-Capture-Microdissection

Für die Laser-Capture-Microdissection (LCM) wurden Pflanzenteile in Paraffin eingebettet. Aus den angefertigten Schnitten wurden mit Hilfe eines Lasers Zellen ausgeschnitten, aus denen anschließend die Gesamt-RNA isoliert wurde. Es wurde statt Paraffin Paraplast® X-tra (Roth) verwendet. Dieses besteht aus hochreinem Paraffin mit Polymeren. Damit ist eine Infiltration der Gewebe bei tieferen Temperaturen (Schmelzbereich: 50-54°C) als mit reinem Paraffin möglich. Außerdem besitzt es eine höhere Pressfestigkeit als reines Paraffin und eine niedrige Viskosität, so dass Pflanzengewebe leichter mit Einbettungsmaterial durchdrungen werden kann. Das enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) ermöglicht faltenfreie Schnitte bis zu 2 µm Dicke. Wichtig war es, dass RNase-frei gearbeitet wurde, also auch DMPC-Wasser zum Ansetzen der Lösungen verwendet wurde (siehe 2.10.1).

Die Einbettungsmethode wurde von Frau Dr. Julia Kehr und Frau Dr. Regine Kleber am Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm (Deutschland) entwickelt und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

2.13.2.1. Fixierung

Die Pflanzen wurden von ihrem Nährmedium befreit, mit Wasser gespült, trocken getupft und mit einer Schere in ca. 1 cm große Stücke geschnitten. Zur Fixierung diente ein kaltes Ethanol-Eisessig-Gemisch (3:1; (v/v)), in dem die Gewebeteile unter leichtem Vakuum bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert wurden.

2.13.2.2. Entwässerung

Die Entwässerung erfolgte durch eine aufsteigende Ethanolreihe. Die Proben wurden mindestens für je 30 min unter leichtem Vakuum mit 75%, 85%, 90%, 95% und 100% Ethanol (v/v) infiltriert. Bei 75% Ethanol sowie bei 90% wurde zum Anfärben der Pflanzenteile eine Spatelspitze Eosin zugefügt.

2.13.2.3. Infiltration mit Paraplast

Bei Infiltration mit Paraplast waren die angegebenen Zeiten Maximalangaben, denn längere Verweilzeiten haben einen ungünstigen Einfluss auf die RNA-Qualität. Die Gewebeproben wurden einmal in einem Xylol-Ethanol-Gemisch (1+1; v/v) und zweimal in 100% Xylol für je 30 min unter

leichtem Vakuum bei Raumtemperatur infiltriert. Neues Xylol (25 ml) wurde im Trockenschrank auf 58°C erwärmt und die Pflanzenteile wurden hinzu gegeben. Nach 15 min wurden ca. 20 Paraplast-Chips hinzugefügt und wiederum für 15 min im Trockenschrank bei 58°C inkubiert. Der Überstand wurde abgegossen und reines geschmolzenes Paraplast wurde auf die Gewebeteile gegeben, in dem die Pflanzen bei 58°C für 30 min infiltriert wurden. Dann wurde das Paraplast gegen neues ausgetauscht und die Proben darin für 30 min bei 58°C gelagert. Der letzte Schritt wurde wiederholt. Die Wurzelstücke wurden mit dem flüssigen Paraplast in Petrischalen, die auf einer Heizplatte bereits mit geschmolzenem Paraplast gefüllt waren, gegossen und ausgerichtet. Nach dem Erstarren des Paraplasts bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C gelagert.

2.13.2.4. RNA-Isolierung aus paraffineingebetteten Schnitten

Bevor die entparaffinisierten Schnitte mit einem Laser-Capture-Microdissection-System (LCM) ausgeschnitten werden konnten, musste die Integrität der RNA im Gewebe überprüft werden. Nach Entparaffinisierung wurden die Schnitte mit Hilfe RNase-Hemmstoffen, wie z. B. Guanidiniumthiocyanat und einem Zellwandaufschluss durch Proteinase K-Behandlung behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert.

Entparaffinisierung

Zur Entparaffinisierung nach Stanta und Schneider [1991] wurden Proben (bis zu 3 mg) mit einer frischen Rasierklinge grob von Paraplast befreit und in 1 ml Xylol für 30 min gegeben. Die Rasierklingen sowie alle Materialien wurden mit RNasefreiem Wasser bzw RNase AWAY (MolecularBioProdukts) vorbehandelt.

Entparaffinisierung und Zellysis-Methode (Handmethode)

Die Methoden von Stanta und Schneider [1991], Coombs [1991; 1999], Ruiz-Manzano et al. [2000], Godfrey et al. [2000], Conn [2002] und Schofield et al. [2003] wurden modifiziert. Es wurden 2 bis 50 Schnitte von 10 µm Dicke mit einem Mikrotom HM 355 S (Micron) angefertigt (siehe 2.13.2.5). Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte in 0,5 ml Xylol mit einem End-Over-End-Schüttler für 20 min geschüttelt und dann für 10 min bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert. Die geschnittenen Wurzeln wurden mit 0,5 ml Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal mit 15000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Proben wurden mit 200 µl Lysispuffer mit 6 mg/ml Proteinase K (Merck) über Nacht bei 58°C inkubiert. Eine andere Möglichkeit zur Lyse war das Erwärmen für drei Stunden bei 55°C und anschließend für drei Stunden bei 45°C. Danach fand eine Inaktivierung der Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 5 min und die RNA-Isolierung über eine Trizol-Extraktion statt (siehe s. u.).

Lysispuffer

Guanidiniumthiocyanat	1 mM
TRIS/HCl	20 mM
Sarcosyl	0,5%
Mercaptoethanol	25 mM
pH-Wert	7,5

Gesamt-RNA-Extraktion nach RNeasy Plant Mini® Kit (QIAGEN)

Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff im Mörser fein zerrieben, dann mit 450 µl RTL-Puffer (Kit) im Mörser gerührt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Eine Alternative war die in flüssigem Stickstoff eingefrorene Probe im Eppendorf-Gefäß mit Hilfe eines angespritzten und angerauten Glasstabs an der Gefäßwand klein zu reiben. Die weitere Behandlung erfolgte nach Kit-Anleitung. Zur Elution wurde RNasefreies Wasser verwendet (siehe 2.10.1).

Gesamt-RNA-Extraktion mit dem TRIZOL® Reagenz

Trizol® (Gibco) ist eine Lösung, die aus Phenol und Guanidinisothiocyanat besteht. In dieser Lösung bleibt RNA während der Lysis und der Homogenisierung der Zellen intakt erhalten. DNA und Proteine werden durch eine Chloroformextraktion abgetrennt und in der wässrigen Phase befindet sich dann die RNA, die mit Isopropanol ausgefällt wird. Die Trizol-RNA-Isolierung ist für kleine Probenmengen (50-100 mg) geeignet und enthält Phenol, in dem sich der Paraplast besser löst als in den Lösungen des RNeasy Plant Mini® Kits (QIAGEN).

Nach Entparaffinisierung wurden die Wurzeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Mörser und Pistill fein zerrieben. Es wurden 800 µl Trizol® in den Mörser gegeben, kurz gerührt und die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und für 15 sec stark geschüttelt. Bei Raumtemperatur wurde das Gemisch für 2-3 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert. Die RNA verblieb in der wässrigen Phase, die mit 0,5 ml Isopropanol versetzt wurde. Bei kleinen Gewebemengen können 2 µl Glycogen (10 mg/ml) zugesetzt werden, um die Fällung der RNA zu verstärken. Glycogen wirkt als Carrier. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C mit 15000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol (v/v) gewaschen, für 5 min bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Prüfung auf RNA-Degradation

Bevor eine Untersuchung mit einem LCM durchgeführt wurde, musste eine Prüfung auf einen RNA-Abbau stattfinden (siehe 3.12.2.3). Auf Grund der geringen Menge an Gesamt-RNA war eine Gehaltsbestimmung und ein Agarose-Gelcheck nicht möglich (siehe 2.10.2.1). Trotzdem wurde die isolierte Gesamt-RNA in cDNA (siehe 2.10.3) umgeschrieben und mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen) und mit Expressionsprimern (siehe Tabelle 56) sowie dem Oligo-dT-Primer (siehe Tabelle 6) und einem 3'RACE-forward-Primer (siehe Tabelle 56) eine Standard-PCR durchgeführt (siehe 2.10.4.1). Mit einem Agarosegel wurde das Ergebnis der PCR überprüft (siehe 2.10.2.1).

2.13.2.5. Schneiden der Paraplast-Blöckchen

Die eingebetteten Pflanzenteile (siehe 2.13.2.3) wurden aus dem Paraplast in Form von Blöcken geschnitten, die dann in Form von Pyramiden getrimmt wurden. Die Rasierklingen sowie alle Materialien wurden mit RNasefreiem Wasser bzw RNase AWAY (MolecularBioProdukts) vorbehandelt. Die Proben wurden mit dem Rotationsmikrotom HM 355 S (Micron) mit frischen! Einweg-Mikrotommessern (Edge-Rite™, Richard-Allan Scientific) auf eine Schnittdicke von 20-40 µm geschnitten. Dabei wurde die Handsteuerung verwendet, so dass Paraplastschnittbänder entstanden. Die Bänder wurden mit Wasser auf Objektträgern bzw. PALM® Membran-Slides aufgezogen. Anschließend wurden sie bei 58°C auf einer Heizplatte gestreckt, getrocknet bis das Wasser verdunstet war und kurz durch 58°C angeschmolzen, so dass sie auf dem Objektträger verblieben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Die PALM® Membran-Slides sind mit einer Membran beschichtet. Durch diese Membran wird die Probe beim Katapultieren mit dem LCM-Laser nach dem Ausschneiden stabilisiert wird.

2.13.2.6. Entparaffinisierung

Die Objektträger wurden für ≤ 5 min in Xylol gegeben und trocknen gelassen. Zur Verbesserung der Bildqualität wurden die Schnitte für ≤ 2 min in Ethanol getaucht. Die entparaffinisierten Schnitte wurden mit Hilfe eines PALM® MicroLaser Systems ausgeschnitten und mit einem Lichtmikroskop untersucht.

2.14. FastProteinLiquidChromatography (FPLC)

Zur Reinigung von Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus Pflanzenrohextrakten (siehe 2.12.7) wurden zunächst Batch-Tests zur Bindung der Enzyme an diverse Säulenmaterialien ausgetestet und anschließend die Ergebnisse auf eine automatisierte Säulenreinigung durch die FPLC übertragen (Fast Protein Liquid Chromatography, Amersham Pharmacia).

Die FPLC-Anlage bestand aus einer programmierbaren Steuereinheit (Gradient Programmer GP-250), die zwei Pumpensysteme (Pump P-500) steuert. Die Proben wurden durch eine Probenschleife von 2 ml Volumen injiziert und durch das Injektionsventil V-7 auf die Säulen aufgetragen. Die Eluate wurden durch eine Durchflusszelle der optischen Einheit (Single Path Monitor UV-1) kontrolliert, in der die Absorption der Proteine bei 280 nm gemessen wurde. Die Absorption wurde mit einem Meßschreiber (REC-482) dargestellt. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler (Fraction Collector Frac-100) gesammelt. Zur Probenvorbereitung wurden Rohextrakte hergestellt (siehe 2.12.7) und auf den jeweiligen Puffer umgepuffert (siehe 2.12.5).

2.14.1. Säulenmaterialien

2.14.1.1. Phenylsepharose® CL-4B – hydrophobe Chromatographie

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie finden Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Seitenketten von Proteinen und dem hydrophoben Säulenmaterial statt. Die Adsorption erfolgt in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, die Elution mit einem absteigenden Salzgradienten.

2.14.1.2. DEAE-Fractogel-Säule - Ionenaustauschchromatographie

Durch die Ionenaustauschchromatographie können Proteine nach Ladung getrennt werden. Dazu werden die Proteine bei niedriger Ionenstärke an das Säulenmaterial gebunden. Die Bindung findet aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen der geladenen Proteinoberfläche und den geladenen Resten des DEAE-Materials (Diethylaminoethanol) statt. Durch eine kontinuierliche Erhöhung der Salzkonzentration werden die Proteine wieder von der Säule eluiert, da die ionischen Wechselwirkungen geschwächt werden. Das DEAE-Fractogel (Merck) ist ein Anionenaustauscher, der aus einem synthetisch auf Methacrylat basierendem Polymerharz besteht, das lange lineare Polymerketten „Tentakeln“ besitzt.

2.14.1.3. Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ist eine Verbindung des Apatits, allgemeine Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3[\text{X}]$, mit dem Hydroxid-Ion OH^- , also $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Dieser Kristall besitzt nicht nur auf Grund der Calciumbindungsstellen die Eigenschaften eines Ionenaustauschers, sondern kann auch als spezifisches Adsorbens für Proteine eingesetzt werden, die selektiv an Phosphatreste binden.

2.14.2. Batch-Test - Vorversuche

Zum Austesten, an welchem Säulenmaterial Homospermidin-umsetzende Enzyme binden, wurde ein Batch-Test ausgeführt. Nach Elution der Proteine von den Säulenmaterialien wurde auf Aktivität getestet (siehe 2.15). In eine leere PD10-Hülse mit Fritte wurden ca. 1-2 ml Säulenmaterial eingefüllt und mit Wasser (10 Säulenvolumen) gewaschen. Dann wurde zum Äquilibrieren des Materials mit viermal 2,5 ml des jeweiligen Bindungspuffers gewaschen. Auf diesen Bindungspuffer wurde auch die Probe umgepuffert (siehe 2.12.5.2), die dem Chromatographiematerial zugefügt wurde. Zur Bindung an die Matrix wurde die Probe in der PD10-Hülse für eine Stunde mit einem End-Over-End-Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend ablaufen gelassen. Mit 1 ml Waschpuffer wurde zunächst für 40 min und anschließend mit neuem Waschpuffer nochmals für 20 min bei 4°C „end-over-end“ inkubiert. Zur Elution wurde zunächst mit 1 ml Elutionspuffer A und anschließend mit 1 ml Elutionspuffer B eluiert, indem jeweils für 30 min „end-over-end“ inkubiert wurde, bevor der Durchlauf aufgefangen wurde.

Säulenmaterial	Phenylsepharose® CL-4B Pharmacia Biotech	DEAE-Fractogel EMD 650 (M) Merck	Hydroxylapaptit Bio-Gel HTP-Powder BioRad
Bindungspuffer	1,5 M KCl pH-Wert 7	0,05 mM KCl	0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7
Waschpuffer	1,5 M KCl pH-Wert 7	0,05 mM KCl	0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7
Elutionspuffer A	0,05 M KCl pH-Wert 7	1 M KCl	0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7
Elutionspuffer B	Wasser	1 M KCl	0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7

Die Puffer enthielten 2 mM DTT.

2.14.3. FPLC - Chromatographie Bedingungen

2.14.3.1. Puffersysteme

Die Puffer enthielten 2 mM DTT (Gerbu). Zum Entgasen wurden die verwendeten Pufferlösungen mit Helium für mindestens 10 min begast.

Säulenmaterial	Puffer A	Puffer B
Phenylsepharose® CL-4B Pharmacia Biotech	1,5 M KCl	0,05 M KCl
DEAE-Fractogel EMD 650 (M), Merck	0,05 M KCl	1 M KCl
Hydroxylapatit Bio-Gel HTP-Powder BioRad	0,005 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7	0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7

2.14.3.2. Reinigung

Zur Optimierung der Reinigung wurden jeweils zwei Puffer verwendet, die mit A und B abgekürzt werden. Die Zusammensetzung ist in der Tabelle (siehe 2.14.3.1) für das jeweilige Säulenmaterial angegeben. Die jeweilige Chromatographie-Säule (ca. 1 ml Säulenvolumen, eigene Konstruktion, Kunststoff-5-ml-Spritze sowie Säule HR5/2 Pharmacia) wurde mit dem zugehörigen Puffer A (siehe 2.14.3.1) mit einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert bis der Mehrkanalschreiber eine ruhige Basislinie aufzeichnete. Die Probe wurde in 3 ml Puffer A (siehe 2.14.3.1) auf die Säule des jeweiligen Säulenmaterials aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Es wurden 30 ml Puffer A zum Waschen der Säule verwendet, die in drei Fraktionen zu je 10 ml gesammelt wurden. Wenn kein Protein mehr von der Säule gewaschen wurde, d. h. die Basislinie sich am Schreiber wieder auf Null eingestellt hatte, wurde die Elution der Proteine gestartet.

Von der Phenylsepharose-Säule wurden die gebundenen Proteine mit absteigenden KCl-Gradienten durch Zumischen des Puffers B von der Säule eluiert (siehe Tabelle in 2.14.3.1).

Von der DEAE-Fractogel-Säule wurden die Proteine mit einem zunehmenden KCl-Gradienten durch Zumischen des Puffers B gewaschen (siehe Tabelle in 2.14.3.1).

Von der Hydroxylapatitsäule wurden die Proteine mit einer zunehmenden Kaliumphosphatpuffer-Konzentration durch Zumischen des Puffers B eluiert (siehe Tabelle in 2.14.3.1).

Puffer-B-Gradient-1

Bei der Elution der Proteine betrug die Flussrate des Puffers 0,5 ml/min. Nach 20 ml war der Puffer B zu 100% eingestellt. Diese Konzentration wurde für 5 ml beibehalten und dann wurde innerhalb von 0,5 ml auf 100% Puffer A eingestellt. Nach 30 ml war die Elution beendet.

Puffer-B-Gradient-2

Die Proteine wurden mit einem Fluss von 0,5 ml/min von der Säule eluiert. Die Puffer-B-Konzentration betrug nach 20 ml 40% und wurde für 5 ml auf 40% gehalten. Dann wurde die Konzentration gesteigert und erreichte nach 30 ml 100%.

Die Fraktionen wurden in 1 ml Größe gesammelt. Zur Regeneration der Säulen wurde 100% des jeweiligen Puffer B verwendet. Fraktionen, die Protein enthielten, wurden mit Hilfe eines Bradfordschnelltest bestimmt (siehe 2.12.4). Positiv getestete Fraktionen wurden einzeln oder vereinigt für einen Aktivitätstest verwendet (siehe 2.15).

2.15. Assay – Aktivitätstest

2.15.1. Substrate

Es kamen folgende Substrate bei den durchgeführten Aktivitätstests zum Einsatz: Putrescin, Spermidin, Spermin und Homospermidin. Ein Zusatz von radioaktivmarkierten Substraten bei Aktivitätstests war häufig nur zum Nachweis eines qualitativen Umsatzes, Analyse des Produktspektrums oder zum Kennen lernen der Reaktion erforderlich. Die Zugabe von kaltem Substrat diente meist zur Produktidentifizierung mittels GC-MS und HPLC.

[¹⁴ C]Substrat			
Putrescin Dihydrochlorid	0,0125 µCi/µl	0,117 mM 161,1 g/mol	25000 cpm/µl
Spermidin Trihydrochlorid	0,0125 µCi/µl	0,112 mM 254,6 g/mol	25000 cpm/µl
Spermin Tetrahydrochlorid	0,0125 µCi/µl	0,109 mM 348,18 g/mol	25000 cpm/µl
Homospermidin Dihydrochlorid	0,014-0,021 µCi/µl	0,07-0,1 mM 268,6 g/mol	28000-42000 cpm/µl

2.15.2. Herstellung von Homospermidin

Für Aktivitätstests musste kaltes und radioaktivmarkiertes Homospermidin synthetisiert werden, da dieses nicht käuflich erwerbbar ist. Zur Herstellung von Homospermidin wurde eine enzymatische Methode angewendet. Dabei wurde die bakterielle Homospermidinsynthase (HSS) aus *Rhodopseudomonas viridis* verwendet [Tholl et al., 1996]. Dieses Enzym setzt Putrescin in einer NAD⁺-abhängigen Reaktion als Substrat zu Homospermidin um. Der Vorteil gegenüber der pflanzlichen HSS ist, dass das bakterielle Enzym kein Spermidin benötigt und dieses dann nicht bei der Aufreinigung zusätzlich abgetrennt werden muss.

Von einem frischen, über Nacht inkubierten Ausstrichs eines *E. coli* BL21(DE3)-Klons transformiert mit der bakteriellen HSS von *R. viridis* wurde eine Bakterienkolonie gepickt und nach Standardbedingungen exprimiert (siehe 2.4.1 und 2.12.10.1). Jedoch wurde hier eine 50 ml Übernachtkultur verwendet und am nächsten Tag wurde 20 ml frisches LB-Ampicillin-Medium zugefügt. Für eine weitere Stunde wurde unter Schütteln inkubiert und zur Induktion 1 mM IPTG zugegeben. Das Pellet wurde in 6 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 8,7; 2 mM DTT) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall (siehe 2.12.8.1) für 5 min aufgebrochen und das Lysat wurde anschließend bei 11950xg (Sorvall® RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 8,7, 2 mM DTT) umgepuffert (siehe 2.12.5.2). Das PD10-Eluat wurde mit NAD⁺ und Putrescin versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation konnten die Reaktionsansätze bei -20°C gelagert werden.

PD10-Eluat mit bakterieller HSS	300 µl	
25 mM NAD ⁺	20 µl	
50 mM [¹² C]Putrescin	200 µl	[entspricht 10 mM]
50 mM Kaliumphosphatpuffer	480 µl	(pH-Wert 8,7; 2 mM DTT)
Σ	1000 µl	
PD10-Eluat mit bakterieller HSS	150 µl	
25 mM NAD ⁺	10 µl	
[¹⁴ C]Putrescin (siehe 2.15.1)	200 µl	[entspricht 10 µCi, 190 µM]
50 mM Kaliumphosphatpuffer	140 µl	(pH-Wert 8,7; 2 mM DTT)
Σ	500 µl	

Für eine Reinigung des [¹²C]Homospermidins wurde eine 3 ml-Kationenaustauscher-Säule mit Dowex-50 W X 8 (Serva) (Korngröße von 100-200 mesh, 1,8% Kapazität) hergestellt. Das Material wurde mit 30 ml 3 M Salzsäure in die protonierte Form überführt und anschließend mit Wasser neutral gewaschen. Der Inkubationsansatz wurde mit 0,2 M Salzsäure angesäuert und auf die Säule aufgetragen. Erst wurde mit 5 ml 0,2 M Salzsäure gespült, dann das nicht umgesetzte Putrescin mit 140 ml 1,4 M Salzsäure eluiert. Zur Elution des Homospermidins wurde zunächst mit 50 ml 2,6 M Salzsäure eluiert. Es wurde durch Dünnschichtchromatographie festgestellt, dass die Elution des Putrescins mit 1,4 M Salzsäure nicht vollständig war. Deshalb wurde zur vollständigen Putrescin-Elution die Säurekonzentration auf 2,6 M erhöht. Die Elution des Homospermidins gelang dann mit 6 M Salzsäure. Kleine Aliquots der einzelnen 10 ml-Fractionen wurden mit der DC bzw. der HPLC auf Putrescin und Homospermidin untersucht (siehe 2.16.1 und 2.16.2).

Bei der Reinigung des [¹⁴C]Homospermidins wurde eine 1 ml Dowex-Kationenaustauschersäule verwendet. Die Säule wurde mit 10 ml 3 M Salzsäure äquilibriert und mit Wasser neutral gewaschen. Die Probe wurde mit 100 µl 0,2 M Salzsäure angesäuert und auf die Säule aufgetragen. Das Reaktionsgefäß wurde mit 1600 µl 0,2 M Salzsäure gespült und diese ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Das nicht umgesetzte [¹⁴C]Putrescin wurde mit 70 ml 1,4 M Salzsäure sowie 17,5 ml 2,6 M Salzsäure eluiert. Das [¹⁴C]Homospermidin wurde anschließend mit 10-15 ml 6 M Salzsäure von

der Säule eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Radio-HPLC und Radio-DC auf Putrescin und Homospermidin untersucht und durch Szintillationsmessung die Radioaktivitätsmenge bestimmt (siehe 2.16.2 und 2.16.4).

Fraktionen, die reines Homospermidin enthielten, wurden unter Luftstrom bis zur Trockene eingengt und bei -20°C gelagert.

2.15.3. Herstellung von [¹⁴C] 1-Pyrrolin

Im Primärstoffwechsel entsteht aus Putrescin durch eine kupferhaltige Aminoxydase 1-Pyrrolin (siehe Einleitung - Abbildung 2), so dass zur Identifizierung von 1-Pyrrolin eine Referenzsubstanz hergestellt werden musste, da diese Substanz nicht käuflich erwerbbar ist. Die Herstellung von [¹⁴C]1-Pyrrolin erfolgte enzymatisch durch eine Methode nach Böttcher [1993], die leicht verändert wurde.

Es wurden 975 µl auf 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7) umgepufferter Erbsenrohextrakt (8 Tage im Dunkeln gewachsen) (siehe 2.12.5.2 und 2.12.7) mit 25 µl [¹⁴C]Putrescin (1,25 µCi; 11,7 nmol) bei 37°C für 3,5 Stunden inkubiert. Der Umsatz wurde mit Hilfe einer Radio-DC überprüft (siehe 2.16.1). Der Inkubationsansatz wurde mit 1 ml 5 M Natronlauge alkalisiert und mit 1 ml Diethylether extrahiert. Nach Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 min wurde die organische Phase abgenommen, mit 0,2 M Salzsäure angesäuert, um das 1-Pyrrolin in seine Hydrochloridform zu überführen, und bis zur Trockene unter einem Luftstrom eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.15.4. Aktivitätsfärbung in nativen PAGE-Gelen

Kupferhaltige Aminoxydasen erzeugen als Produkt u. a. Wasserstoffperoxid (siehe Einleitung - 1.5), das man mit 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazolinsulfonsäure) (ABTS) nachweisen kann [Koyanagi et al., 2000]. Ein Chinonprotein wird durch eine graugrüne Farbe angezeigt. Die Färbung ist nicht stabil und verblasst nach einer bis zwei Stunden.

Proteinproben wurden mit einer nativen PAGE elektrophoretisch getrennt (siehe 2.12.2). Das erhaltene Gel wurde in 100 mM HEPES (*N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure, pH-Wert 7,0) mit 1 mM Putrescin oder Homospermidin als Substrat, 2 mM ABTS sowie 10 Units/ml Meerrettich-Peroxidase (Serva) gegeben. Die Inkubation des Gels erfolgte bei 37°C für 45-60 min im Dunkeln.

2.15.5. Photometrische Assays

Die Aktivität von kupferhaltigen Aminoxydasen lässt sich durch eine Vielzahl von kolorimetrischen Verfahren bestimmen. Dabei wird meistens das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid bestimmt (siehe Einleitung - 1.5).

2.15.5.1. ABTS-Methode

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazolinsulfonsäure) (ABTS) dient zum Nachweis von Wasserstoffperoxid (siehe 2.15.4). Nach Szutowicz et al. [1984] wurde eine Kalibrierkurve mit 30% Wasserstoffperoxid

im Bereich von 10 bis 80 nmol in 0,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit 0,5 ml ABTS-Reagenz (1,8 mM in 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH-Wert 4 mit 10 U/ml Meerrettich-Peroxidase) hergestellt. Die Lösung wurde gemischt, nach 25 sec mit 0,25 ml Stopplösung versetzt (0,75 M Salzsäure mit 5% SDS; pH-Wert 2,1-2,3) und das gefärbte Produkt bei 414 nm gemessen. Ein Blindwert bestand aus 0,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,4) und 0,5 ml ABTS-Reagenz. Rohextraktproben (siehe 2.12.7) wurden auf 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,4) umgepuffert (siehe 2.12.5.2) und mit 1 mM Putrescin sowie Puffer versetzt, so dass das Endvolumen 0,5 ml betrug. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert, anschließend 0,5 ml ABTS-Reagenz zugesetzt und wie die Standards weiterbehandelt.

2.15.5.2. Wasserstoffperoxid-Titan-Komplex-Methode

Nach Nag et al. [2000] bildet Wasserstoffperoxid mit Titanionen einen orange-gelben Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 410 nm besitzt. Ein 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7) enthielt 10 mM Catechol (Hemmstoff der Catalase und der Peroxidase) und 3 mM Putrescin. Eine Kalibrierkurve wurde mit 30% Wasserstoffperoxid erstellt, so dass die Absorption bei 410 nm zwischen 0,1 bis 1,0 lag (0,16-0,8 μM). Es wurden Standards aus 100 μl Titansulfatlösung, Wasserstoffperoxidlösung und Puffer in einem Gesamtvolumen von 1000 μl hergestellt. Ein Blindwert bestand aus 0,9 ml Puffer und 0,1 ml Titansulfatlösung. 300 μl umgepufferte Rohextraktprobe (siehe 2.12.7 und 2.12.5.2) wurden mit 0,5 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer versetzt und für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie die Standards behandelt. Vor der Messung bei 410 nm im Photometer wurden die Proben zentrifugiert, um ausgefallenes Titan(II)sulfat abzutrennen.

15% Titansulfat-Lösung in 23% Schwefelsäure

Es wurden 1,5 g Titanoxidsulfathydrat mit wenigen Millilitern 50% Schwefelsäure versetzt, auf der Heizplatte unter Rühren erhitzt und solange Säure zugegeben bis sich der Feststoff gelöst hatte. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und gegebenenfalls filtriert.

2.15.5.3. Eisen-Xylenol-Orange-Komplex

Die Methode nach Cona [1993] wurde modifiziert. Sie basiert auf der Oxidation von Eisen(II)-ionen zu Eisen(III)-ionen durch Wasserstoffperoxid. Eisen(II)-ionen bilden mit Xylenol-Orange einen gelben Komplex. Die Eisen(III)-ionen bilden ein violettes Produkt, das ein Absorptionsmaximum bei 582 nm besitzt.

Eine Kalibrierkurve wurde mit 30% Wasserstoffperoxid in einem Bereich von 2-32 μM angesetzt. Dazu wurden 900 μl Reagenz1 mit Wasserstoffperoxid und Wasser auf 1000 μl ergänzt. Die Lösung wurde für eine Stunde bei 22,5°C inkubiert. Ein Blindwert bestand aus 900 μl Reagenz1 und 100 μl Wasser. Rohextraktproben (siehe 2.12.7 und 2.12.5.2) wurden auf 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7) umgepuffert. Es wurden 0,2 oder 0,5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7, mit 3 mM Putrescin) sowie 0,3 ml Probelösung bei 37°C für 30 bis 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe wie die Standards behandelt und die Absorption bei 582 nm am Photometer gemessen.

Eine Eisen(III)chlorid-Kalibrierkurve zur Bestimmung des Eisen(III)-Gehaltes in den Standards und in den Proben wurden mit 900 µl Reagenz2 in einem Bereich von 2-50 µM Eisen(III)chlorid und Wasser angesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 12 ml.

	Reagenz1	Reagenz2
Ammoniumeisen(II)sulfat	250 µM	-
Schwefelsäure	25 mM	25 mM
Xylenol-Orange	100 µM	100 µM
Sorbitol	100 mM	100 mM

2.15.6. Inkubationsansätze für Radioassay

Eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung von Enzymaktivitäten ist ein Radioassay. Dazu wurde entweder nur ein radioaktivmarkiertes [¹⁴C]Substrat (siehe 2.15.1) oder zusätzlich ein nicht radioaktivmarkiertes Substrat zum Reaktionsansatz zugefügt. Da noch kein Aktivitätstest im Institut für kupferhaltige Aminoxygenasen etabliert war, musste einer entwickelt werden. Dieser wurde während dieser Arbeit ständig weiter optimiert und deshalb waren die Inkubationsbedingungen der Ansätze sehr unterschiedlich. Die Reaktionsvolumen wurden dem Versuch entsprechend angepasst. Die Proben wurden bei 30°C bzw. 37°C inkubiert, nach 5 Minuten bis 20 Stunden zu verschiedenen Zeitpunkten 10 µl Aliquots genommen, auf eine Kieselgel-DC-Platte (20x20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, mit Fluoreszenzindikator von Merck) aufgetragen und mit Hilfe der Radio-DC (siehe 2.16.1) untersucht. Einige Ansätze, die mit kaltem Substrat versetzt worden sind, wurden mit der GC-MS (siehe 2.16.3) oder auch der HPLC (siehe 2.16.2) untersucht.

2.15.6.1. Pflanzenrohextrakte

Umgepufferte Pflanzenrohextrakte (siehe 2.12.7) wurden direkt für einen Aktivitätstest eingesetzt oder erst nach FPLC-Reinigung (siehe 2.14):

Proteinextrakt	x µl	
Catalase	0,3 U/µl	
Alkoholdehydrogenase	0,1 U/µl	
100 mM NADH	1 mM	
40 mM Cu ²⁺ -Ionen	-	
[¹⁴ C]Substrat	1-3,5 µl	[12,5-44 nCi/25000-87500 cpm]
Σ	30-70 µl	

2.15.6.2. *Pichia pastoris*-Proben (siehe 2.12.13):

Proteinextrakt	x µl	
Catalase	0,2-0,6 U/µl	
Alkoholdehydrogenase	0,04-0,1 U/µl	
100 mM NADH	1 mM	
40 mM Cu ²⁺ -Ionen	0-33 µM	10 mg/ml CuSO ₄ ·5H ₂ O
[¹⁴ C]Substrat	0,15-2,5 µl	1,875-32 nCi/1875-62500 cpm
Substrat	0-3,5 mM	
Σ	30-500 µl	

2.15.6.3. E. coli-Proben (siehe 2.12.10):

Proteinextrakt	x µl	
Catalase	0,2-0,7 U/µl	
Alkoholdehydrogenase	0,1 U/µl	
100 mM NADH	1 mM	
40 mM Cu ²⁺ -Ionen	0- 100 µM	10 mg/ml CuSO ₄ ·5H ₂ O
[¹⁴ C]Substrat	0,3-3,5 µl	3,75-32 nCi/1875-62500 cpm
Substrat	0-3,5 mM	
Σ	30-500 µl	

2.15.6.4. Dialyse-Proben mit erhöhter Luftzufuhr (siehe 2.12.12)

Dialyseproben wurden unter Schütteln (Thermomixer 5436 Eppendorf) bei 30°C bis zu einer Stunde mit seitlicher Druckluftzufuhr inkubiert. Die Gefäßdeckel waren dabei geöffnet. Alle 5 min wurden die Ansätze mit geschlossenem Deckel kurz gemischt.

Proteinextrakt	x µl	
Catalase	9,4 µl	0,66 U/µl
Alkoholdehydrogenase	12,5 µl	0,10 U/µl
100 mM NADH	2,5 µl	1 mM
40 mM Cu ²⁺ -Ionen	0,05 µl	8 µM
		(Stammlösung 10 mg/ml CuSO ₄ ·5H ₂ O)
[¹⁴ C]Substrat	2-2,5 µl	25-32 nCi/50000-62500 cpm
Substrat	0,120-2,5 µl	0,5-1 mM
Σ	250 µl	

Enzym	Firma	Einheit
Alcoholdehydrogenase from yeast	Serva	205-223 U/mg
Catalase from Bovine Liver	Sigma	1600-1780 U/mg

2.15.7. Positivkontrollen

Mit Hilfe von Erbsenrohextrakten (siehe 2.12.7), einer Schweineniere-Diamin-Oxidase (Sigma) und einer Rinderplasma-Aminoxidase (Worthington) wurden Inkubationsansätze als Positivkontrollen zur Überprüfung von Assays durchgeführt. Dabei sollte der Umsatz qualitativ getestet werden. Das entstehende Produktspektrum stand im Vordergrund.

Enzym	Firma	Einheit
Plasma Amine Oxidase (BPAO)	Worthington	0,004 U/mg
Diamine Oxidase from Porcin Kidney	Sigma-Aldrich	0,08 U/mg

2.15.7.1. Erbsenrohextrakte

Erbsenrohextrakte (siehe 2.12.7) wurden nicht umgepuffert und umgepuffert für ein Assay eingesetzt. Dazu wurden 18 µl Proteinextrakt mit 2 µl [¹⁴C]Substrat (siehe 2.15.1) versetzt.

2.15.7.2. Rinderplasma-Aminoxidase

Um den Reaktionsmechanismus einer Aminoxidase mit Homospermidin sowie anderen Polyaminen aufzuklären, wurde die Methode nach Lee und Sayre [1998] modifiziert. Die Rinderplasma-Aminoxidase BPAO (Endkonzentration: 0,0009 – 0,02 U/μl) wurde in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer gelöst, mit Catalase (4 U/μl; Endkonzentration 0,04 U/μl) und mit 1 bis 2 μl [¹⁴C]Substrat (siehe 2.15.1) versetzt. Bei einigen Inkubationen mit Homospermidin wurde zusätzlich [¹²C]Homospermidin (1 μg/μl; Endkonzentration 0,1 bis 1 μg/μl) zugefügt. Der Ansatz wurde für 2 bis 20 Stunden bei 22,5°C oder bei 30°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Zur Reduktion wurden NaBH₄-Lösung (0,2 mM in 1 M Natronlauge) oder 0,03 U/μl Alkoholdehydrogenase mit 0,3 mM NADH zugefügt. Die Reduktion fand für 20 bis 60 min bei 22,5°C oder bei 30°C unter Schütteln statt. Es wurden nicht reduzierte und reduzierte Proben mit der Radio-DC untersucht (siehe 2.16.1).

2.16. Methoden zur Analyse von Substanzen aus Inkubationsansätzen

Zur Trennung und Identifizierung von Substanzen aus Inkubationsansätzen (siehe 2.15.6) wurden die Dünnschichtchromatographie (DC), die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC-MS) angewendet.

2.16.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Trennung von Substanzen wurden Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm von 20x20 cm bzw. 10x20 cm (Merck) eingesetzt. Die Entwicklung der Platten erfolgte bei Raumtemperatur mit einem der drei Fließmittelsysteme (siehe 2.16.1.1). Zur Identifizierung wurden Referenzsubstanzen eingesetzt und die R_F-Werte bestimmt. Weiterhin wurden einige DC-Platten bei 366 nm und 254 nm betrachtet.

2.16.1.1. Fließmittel

Polyamin-FM [Toppel et al., 1987]	(v/v/v)	PA-FM	(v/v/v)	Necinbasen-FM Tropanalkaloide (TAS)	(v/v/v)
Aceton	40	Dichlormethan	82	Ethylacetat	45
Methanol	30	Methanol	15	Isopropanol	35
Ammoniak (25%)	20	Ammoniak (25%)	3	Ammoniak (25%)	20
		Kammersättigung, Zugabe von Methanol bis eine klare Lösung entstanden war.		Kammersättigung	

2.16.1.2. Detektion

RITA-System (Rapid Intelligence TLC Analyser, Raytest)

Zur Messung von radioaktivmarkierten Substanzen, die während Aktivitätstests (siehe 2.15.6) entstanden waren und zur Kontrolle der Homospermidin- und 1-Pyrrolinsynthese (siehe 2.15.2 und 2.15.3), wurde die Radio-DC eingesetzt. Nach einer Dünnschichtchromatographie (siehe 2.16.1) wurde die Detektion von radioaktivmarkierten Substanzen mit dem RITA-System (Rapid Intelligence

TLC Analyser, Raytest) mit Hilfe eines Geiger-Müller Zählrohrs (Zählgas: Argon/Methan, 90/10, Linde) durchgeführt.

Sprühreagenzien

Ninhydrin-Reagenz zum Nachweis von Aminosäuren, Aminen und Aminosuktern

Aminogruppen verfärben sich mit Ninhydrin rosa-violett [Stahl, 1967]. Einige DC-Platten wurden mit einem Ninhydrin-Reagenz besprüht und dann für 10 min bei 110°C erhitzt.

Ninhydrin-Reagenz: 100 mg Ninhydrin gelöst in 2 M Essigsäure, mit n-Butanol auf 100 ml aufgefüllt.

2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz zum Nachweis von freien Aldehyd- und Ketogruppen

Gesättigte Aldehyd- und Ketogruppen wurden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) detektiert. Hydrazonverbindungen der gesättigten Keton-DNPH ergeben eine Blaufärbung. Gesättigte Aldehyd-DNPH reagieren langsamer zu olivgrünen Farbflecken. Ungesättigte Verbindungen reagieren nicht mit dem Reagenz [Stahl, 1967]. Eine getrocknete DC-Platte wurde mit Lösung I und II besprüht. Anschließend wurde zusätzlich mit 0,2% Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung in 2 M Salzsäure besprüht.

Lösung I: 0,4% DNPH gelöst in 2 M Salzsäure

Lösung II: 1 g DNPH gelöst in 1000 ml Ethanol mit 10 ml konzentrierter Salzsäure

2.16.2. Bestimmung von Polyaminen mit der HPLC

Zur UV-Detektion von Polyaminen mit der HPLC mussten diese nach einer modifizierten Methode nach Redmond und Tseng [1979] derivatisiert werden.

Zur Benzoylierung wurden Proben (Maximalvolumen 0,5 ml) mit 0,5 ml 2 M Natronlauge alkalisiert und dann mit 10 µl Benzoylchlorid versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 sec kräftig geschüttelt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde zum Stoppen der Reaktion 1 ml gesättigte Natriumchloridlösung zugegeben. Nach Zugabe von 2 ml Diethylether wurden die benzoylierten Polyamine ausgeschüttelt. Anschließend wurde nach Zentrifugation für 5 min bei 10000 rpm (Tischzentrifuge Sigma 201 M) 1 ml der organischen Phase abgenommen und unter Luftstrom bis zur Trockne eingedunstet. Diese Proben wurden bei 4°C oder -20°C gelagert. Für eine HPLC-Bestimmung wurde der Rückstand in 50-100 µl Methanol (HPLC grade) aufgenommen. Die Identifikation der Substanzen erfolgte über die Retentionszeiten (R_T -Werte) von Referenzsubstanzen. Für quantitative Untersuchungen wurde Cadaverin (250 nmol) als interner Standard zu den Proben gegeben.

Die HPLC-Anlage war ein System von Merck-Hitachi mit der L-6200 Intelligent Pump Pumpenanlage. Die Trennung erfolgte isokratisch durch ein Fließmittel, das aus 40% Acetonitril und 60% 1,5% Phosphorsäure (v/v) zusammengesetzt war [Flores und Galston, 1982; Böttcher et al., 1993]. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die 20 µl-Probevolumen wurden über ein Rheodyne Injektionssystem 7125 injiziert. Die Trennung erfolgte durch ein PR18-Säulenmaterial Nucleosil 120

(5 µm Korngröße, 250 mm Länge und 4 mm innerer Durchmesser, Macherey-Nagel) und die Detektion erfolgte am L-4200 UV-VIS Detektor bei 230 nm (Empfindlichkeit: 0,02).

Radioaktivmarkierte Substanzen wurden neben der UV-Detektion bei einer HPLC-Messung mit Hilfe des Bertold LB 506 D HPLC-Radioaktivitätsmonitors bestimmt. Das HPLC-Eluat wurde mit der HPLC Pump LB 5035 (Berthold) mit dem dreifachen Volumen an ULTIME-FLO™ M-Liquid Scintillation Counting Cocktail (Perkin Elmer) vermischt und dann durch die 2 ml-Meßzelle des Radioflow Detector LB508 (Berthold) geleitet. Eine Identifizierung erfolgte über radioaktive Referenzsubstanzen.

2.16.3. GC-MS-Messung

Zur Identifizierung von unbekannten Produktpeaks, die bei DC-Versuchen (siehe 2.16.1) aufgetreten waren, wurde die Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC-MS) eingesetzt. Dazu wurde ein methanolischer Extrakt von Inkubationen mit [¹²C]Substrat (siehe 2.15.6) hergestellt. Dieser wurde unter Luftstrom zur Trockene eingeeengt und derivatisiert, um leichtflüchtige, mit der GC analysierbare Verbindungen herzustellen. Die derivatisierten Substanzen wurden durch ein organisches Lösungsmittel extrahiert und unter Luftstrom bis zur Trockene eingeeengt. Anschließend wurden die Proben mit der GC-MS untersucht. Zunächst musste eine geeignete Derivatisierungsmethode für die unbekannten Produkte gefunden werden. Die Effizienz der Derivatisierung wurde mit der Flüssigszintillationsmessung untersucht (siehe 2.16.4).

2.16.3.1. Derivatisierung mit MCF

Methylchloroformiat (MCF) wird hauptsächlich zur Derivatisierung von Aminosäuren verwendet. Getrocknete Proben wurden mit 100 µl 0,1 M Salzsäure, 500 µl 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung sowie 50 µl MCF versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde anschließend zweimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt.

2.16.3.2. Derivatisierung mit MSTFA

Zur Silylierung wurde *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) eingesetzt.

Methode 1: Es wurde die getrocknete Probe mit 50 µl MSTFA, 50 µl Acetonitril und 0,5 µl Trimethylchlorosilan (TMCS) versetzt. TMCS wirkt wie ein Katalysator, um die Reaktionsausbeute bei einigen Aminen und Amiden und für sterisch gehinderte Hydroxyle zu erhöhen. Die Mischung wurde für 2,5 h bei 150°C inkubiert.

Methode 2: 50 µl Acetonitril und 25 µl MSTFA wurden zur getrockneten Probe gegeben und für 15 min bei 70°C inkubiert.

Methode 3: Zur getrockneten Probe wurde 50 µl MSTFA gegeben und für 1 Stunde bei 55°C inkubiert.

Nach den Inkubationen (Methode 1-3) wurden je 100 µl Ethylacetat und Wasser zugegeben, geschüttelt und für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert.

2.16.3.3. Reinigung von Substanzen aus Inkubationsansätzen durch DC-Trennung

Einige Inkubationsansätze (siehe 2.15.6) wurden auf eine DC-Platte aufgetragen, in einem Fließmittel entwickelt (siehe 2.16.1), die Platten an der Luft getrocknet, Substanzen aus dem Kieselgel gekratzt und das Kieselgel in eine Extrelut-Säule mit Fritte gegeben. Die Substanzen wurden mit Wasser von dem Material eluiert und unter Luftstrom zur Trockene eingeeengt. Anschließend wurden sie mit der GC-MS nach Derivatisierung untersucht (siehe 2.16.3.1 und 2.16.3.2).

2.16.4. Flüssigszintillationsmessung

Flüssigszintillationsmessungen wurden mit dem „liquid scintillation counter PW 4700“ Isotopenmeßgerät (Philips) durchgeführt. Dazu wurden 3,2 ml Cocktail (LUMASAFE™ PLUS, Lumac*LSC B.V.) mit 1-20 µl Probe versetzt, gemischt und vermessen. Die Ergebnisanzeige erfolgte in Zerfällen pro Minute (cpm).

3. Ergebnisse

3.1. Vergleichende Untersuchung einer CAO

3.1.1. CAO aus *Pisum sativum* (PSAO)

Zu Anfang dieser Arbeit lagen noch keine Erkenntnisse über kupferhaltige Aminoxygenasen (CAOs) im Institut vor, z. B. wie die Sequenzen aufgebaut sind, wie sich diese Proteine verhalten und welche Eigenschaften sie besitzen. Um Eigenschaften einer CAO besser kennen zu lernen und um eine Positivkontrolle für Assays zu etablieren, wurde versucht, eine bekannte Sequenz einer kupferhaltigen Aminoxygenase von *Pisum sativum* (PSAO) in *E. coli* zu sowie in *Pichia pastoris* zu exprimieren. Tipping und McPherson [1995] haben eine PSAO-cDNA identifiziert. Koyanagi et al. [2000] haben die Expression der PSAO, bestehend aus 674 Aminosäuren einschließlich der Signalpeptidsequenz, in *E. coli*-Zellen mit verschiedenen Vektorsystemen getestet, aber das rekombinante PSAO-Protein bildete Inclusion-bodies. Die PSAO konnte dagegen mit dem *Pichia pastoris*-Expressionssystem erfolgreich heterolog exprimiert werden.

3.1.1.1. Das bakterielle Expressionssystem

Gesamt-RNA-Gewinnung

Untersuchungen mit Erbsenkeimlingen haben ergeben, dass zwischen dem 7. und 10. Tag die DAO-Aktivität am höchsten war [Güvenilir und Deveci, 1996]. Auch zeigten Erbsen, die im Dunkeln angezogen wurden, eine größere Aktivität als im Sonnenlicht kultivierte Erbsen. Aus diesem Grund wurden die hier verwendeten Erbsen im Dunkeln angezogen und nach neun Tagen Gesamt-RNA aus den oberirdischen Pflanzenteilen mit dem RNeasy Plant Mini[®] Kit gewonnen (siehe 2.10.1). Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit einer Reversen-Transkriptase (siehe 2.10.3.1).

Klonierung von der PSAO (CAO von *Pisum sativum*)

Anschließend wurde der offene Leserahmen der PSAO-Sequenz einschließlich der Signalpeptidsequenz nach Koyanagi et al. [2000] unter der Verwendung von genspezifischen Full-Length-Expressionsprimern (siehe Tabelle 10) mit der Pfx-DNA-Polymerase bei konstanter Annealing-Temperatur von 60,5°C in einem 25 µl Ansatz amplifiziert (siehe 2.10.4.3). Zur Klonierung des erhaltenen 2,02 kb großen Fragmentes in den pET3a-Expressionsvektor (siehe Tabelle 5) enthielten diese Primer eine *Nde*I-Schnittstelle am 5'-Ende vor dem Start ATG und eine *Bam*HI-Schnittstelle hinter dem Stoppcodon am 3'-Ende.

95°C	5 min	} 35 x
95°C	45 sec	
60,5°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Oligo-Peptid	Sequenz
Exp-ErbseDAO-For	5'-ATATA <u>CATATG</u> G CTT CCA CCA CCA CCA TGA GAC-3'
	Expressionsprimer Forward T_m: 68,2°C <i>NdeI</i> -Schnittstelle
Exp-ErbseDAO-Rev	5'-ATT <u>GGATCC</u> TTA ATT GGA GCA ACC AGG CCA TGC-3'
	Expressionsprimer Reverse T_m: 69,5°C <i>BamHI</i> -Schnittstelle

Tabelle 10: Genspezifische Expressionsprimer für die Expression der PSAO (*Pisum sativum*) in *E. coli* (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, das Start-ATG ist fett gedruckt).

Der pET3a-Expressionsvektor und das gereinigte Amplifikat wurden nach einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* mit anschließender Säulenreinigung in einer Ligation kloniert (siehe 2.10.8) und in *E. coli* DH5 α -Zellen (siehe Tabelle 2) transformiert. Nach einem Klon-Screening mit den Expressionsprimern (siehe Tabelle 10) und nach Minipräparation sowie Restriktionsanalyse wurden zwei positive Plasmide identifiziert (siehe 2.10.12). Zur Überexpression sollten diese isolierten Plasmide in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert werden. Obwohl die isolierten Plasmide positive Ergebnisse beim Kloncreening und den Restriktionskontrollen zeigten, blieben mehrere Anläufe erfolglos. Bei zehn Transformationen wurden insgesamt zehn Bakterienkolonien erhalten, von denen nur drei das Plasmid enthielten. Ursache für die geringe Transformationseffizienz lag eventuell an der Entstehung von toxischen Produkten durch die PSAO. Bei der T7-RNA-Polymerase ist immer eine schwache Hintergrundexpression vorhanden, so dass möglicherweise auch ohne IPTG-Zusatz schon die PSAO gebildet wurde (siehe 2.12.10). Nach Alarcon [1970] werden die Polyamine Spermin und Spermidin durch eine „Diaminoxidase“ zu instabilen Aldehyden abgebaut, die durch spontane β -Elimination Acrolein, ein toxisches Produkt, bilden. Auch entsteht beim Substratumsatz das Zellgift Wasserstoffperoxid (siehe Einleitung - 1.5). Eine Möglichkeit zur Unterdrückung der Hintergrundexpression ist die Transformation des Plasmids in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysE (siehe Tabelle 2 und siehe 2.12.10). Dieser ist für eine Überexpression von toxischen Genen geeignet. Bei einer Transformation der PSAO-Plasmide in die BL21(DE3)pLysE-Zellen wurden sehr viele Klone (> 100 pro LB-Platte) erhalten, von denen nur etwa die Hälfte das Plasmid enthielten. Eine Plasmidinstabilität könnte eine hohe Anzahl an Klonen verursachen. Bei einer Plasmidinstabilität überwachsen Zellen ohne Plasmid sehr schnell die Kultur, wenn das Antibiotikum zur Selektion aufgebraucht ist. Bei Ampicillin findet durch die β -Lactamaseproduktion ein ständiger Abbau statt. Ein Plasmidstabilitätstest nach dem pET-Handbuch (Novagen) konnte keine Instabilitäten des eingesetzten Plasmids nachweisen. Somit konnte eine Instabilität des transformierten Plasmids als Ursache für die hohe Anzahl an Klonen ohne Plasmid ausgeschlossen werden.

Expressionsbedingungen

Für die Expression der PSAO wurde das T7-RNA-Polymerase-System unter der Kontrolle des T7-Promotor ausgewählt [Studier, 1991]. IPTG induziert die Expression der T7-RNA-Polymerase (siehe 2.12.10). Verwendet wurden die *E. coli*-Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysE (siehe

Tabelle 2). *E. coli* BL21(DE3)-Zellen sind universell für Induktionen mit hohen Proteinexpressionen einsetzbar. Im Gegensatz dazu sind die Proteinausbeuten beim *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysE geringer, aber er ist zur Expression von toxischen Genen verwendbar (s. o.).

Die Expression von positiv getesteten Klonen der BL21(DE3)-Transformationen wurde in LB-Medium (500 µl bis 25 ml Kulturvolumen) bei 37°C mit 1 und 2 mM IPTG-Zusatz zur Induktion getestet. Die Induktionszeit betrug eine bis zu sechs Stunden. Die berechnete Molekülmasse der PSAO beträgt nach Koyanagi et al. [2000] 73,6 kDa. Es war keine Expression in SDS-PAGE-Gelen nachweisbar (siehe 2.12.1).

Da es sich bei der PSAO um ein für *E. coli* toxisches Gen handeln könnte, wurde außerdem ein Expressionsprotokoll von Invitrogen für die positiv getesteten BL21(DE3)pLysE-Klonen angewendet. Dabei wurde eine Transformation nicht auf eine LB-Platte aufgetragen, sondern direkt in LB-flüssig-Medium gegeben und anschließend nach 2.12.10.1 verfahren. Auch hier wurden die Induktionsbedingungen variiert. Das Kulturvolumen betrug 500 µl bis 25 ml, es wurden 50 µM und 100 µM Cu²⁺-Ionen zur Unterstützung der TPQ-Biogenese zugesetzt (siehe 1.5) und mit 0,4 - 2 mM IPTG wurde für 1 bis 20 Stunden bei 25°C und bei 37°C die Induktionsstärke variiert. Auch wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der Induktion in Bezug auf die Wachstumsphase, in der sich die Bakterien befinden, einen Einfluss auf die Expression haben könnte. In keinem Fall konnte eine Expression der PSAO in SDS-PAGE-Gelen nachgewiesen werden (siehe 2.12.1).

Um eine PSAO-Expression zu erhalten, wurden weitere Faktoren bei der Expression der positiv getesteten BL21(DE3)- und BL21(DE3)pLysE-Klonen verändert. Es wurden die Kupfer(II)-Ionen gleichzeitig mit dem IPTG zur Kultur erst zum Zeitpunkt der Induktion zugefügt, um so das Wachstum der Bakterien durch das Schwermetall nicht zu hemmen. Da auch diese Versuche nicht zum Erfolg führten, wurde als neue Strategie das Kulturmedium verändert. Es wurde M9-Minimalmedium (siehe 2.4.1) statt des LB-Mediums verwendet. Es wurde bei 25°C sowie bei 37°C von drei Stunden bis zu zwei Tagen die Induktion im M9-Medium durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Wachstumsrate der BL21(DE3)pLysE-Zellen im Gegensatz zu den BL21(DE3)-Zellen in diesem Medium sehr gering war. Nach mehr als 40 Stunden Inkubation bei 37°C war erst eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,8-1,2 erreicht. Ein Problem hierbei war, dass das zur Selektion eingesetzte Antibiotikum Ampicillin durch β -Lactamaseproduktion ständig abgebaut wurde und somit nichtresistente Zellen die Kultur überwachsen konnten. Eine Expression ließ sich nicht nachweisen. Nach dem Schwermetallzusatz von Kupfer(II)ionen zur Unterstützung der TPQ-Bildung zum M9-Medium bereits in der Konzentration von 50 µM wurde das Wachstum der *E. coli*-Zellen vollständig gehemmt. Die Vermutung, eine pH-Wertänderung des Nährmediums während der Inkubation könnte einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen im Minimalmedium haben, hat sich nicht bestätigt.

Bei einer oxidativen Deaminierung durch eine CAO entstehen zytotoxische Oxidationsprodukte, z. B. Wasserstoffperoxid und Acrolein. Averill-Bates et al. [1994] konnten zeigen, dass die Zytotoxizität bei einem Zusatz von Alkoholdehydrogenase und Catalase vollständig beseitigt werden konnte. Die

Catalase baut Wasserstoffperoxid ab und die Alkoholdehydrogenase entfernt den Produktaldehyd (siehe Einleitung- 1.5), aus dem das zytotoxische Acrolein entsteht. Sharmin et al. [2001] konnten die Zytotoxizität bei einer Rinderserum-Aminoxidase durch Aldehyddehydrogenasezusatz verhindern. Zum Entfernen dieser zytotoxischen Oxidationsprodukte, die durch die PSAO entstanden sein konnten, wurde Catalase (0,2-20 U/ml) mit oder ohne Alkoholdehydrogenase (0,1 U/ml) zum LB- sowie M9-Minimalmedium zugesetzt. Auch diese Variation zeigte keine deutliche Überexpressionsbande in SDS-PAGE-Gelen.

Es wurde dem Institut aus der japanischen Arbeitsgruppe von Dr. Katsuyuki Tanizawa (Institute of Scientific and Industrial Research der Universität, Osaka) der Kontrollklon pEPO-02 der bakteriellen Phenylethylaminoxidase, einer CAO von *Arthrobacter globiformis*, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieser sollte als eine Positivkontrolle für eine Expression und für ein Assay dienen. Die Expression des Kontrollklons erfolgt nach einer modifizierten Methode nach Matsuzaki et al. [1994]. Dazu wurde dieser in LB-Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen, anschließend mit 0,4 mM IPTG für zwei bis drei Stunden bei 25°C oder 37°C bis zu einer $OD_{600} > 1$ inkubiert (siehe 2.12.10) und die Expression in einem SDS-PAGE-Gel untersucht. Eine Überexpression des rekombinanten Proteins im Bereich von 70,6 kDa nach Matsuzaki et al. [1994] war nicht nachweisbar.

Obwohl keine Überexpressionsbande der PSAO und dem Kontrollklon pEPO-02 im SDS-PAGE-Gelcheck sichtbar war, wurden Aktivitätsversuche mit dem umgepufferten Bakterienrohextrakt durchgeführt (siehe 3.8). Es war weder Aktivität beim Kontrollklon pEPO-02 noch bei der PSAO der Erbse durch ein Photometrie- oder Radioassay messbar (siehe 2.15).

3.1.1.2. Etablierung des Expressionssystems *Pichia pastoris* am Beispiel der PSAO aus *Pisum sativum*

Da das bakterielle Expressionssystem bei der Expression der PSAO (Aminoxidase von *Pisum sativum*) Schwierigkeiten aufwies und die PSAO erfolgreich in *Pichia pastoris* kloniert und heterolog exprimiert worden ist [Koyanagi et al., 2000], wurde versucht das Hefe-Expressionssystem *Pichia pastoris* zur Expression der PSAO im Institut zu etablieren.

Pichia pastoris ist ein Eukaryot, der posttranslationale Modifikationen eines Proteins durchführen kann. Dazu gehören Disulfidbrückenbildung, Glykosylierungen und Phosphorylierungen. Auf diese Weise ist es auch möglich, Proteine, die in *E. coli*-Expressionssystemen nur als Inclusion-Bodies exprimiert werden, als aktive Proteine zu erhalten. *Pichia pastoris* ist eine methylotrophe Hefe, die durch eine Alkoholoxidase sogar Methanol als einzige Kohlenstoffquelle metabolisieren kann. Methanol wird zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid oxidiert. Anschließend wird Formaldehyd durch zwei Dehydrogenasen zu Ameisensäure und CO₂ oxidiert. Zwei Gene codieren eine Alkoholoxidase in dieser Hefe: *AOX1* und *AOX2*, wobei *AOX1* für den Hauptanteil der Alkoholoxidaseaktivität verantwortlich ist. Der Wildtyp wächst schnell auf methanolhaltigem Medium (Phänotyp: Mut⁺). Bei Verlust oder Beschädigung des *AOX1*-Gens wird die Alkoholoxidaseaktivität stark reduziert und die Zellen wachsen sehr langsam auf methanolhaltigem Medium (Phänotyp: Mut^S,

Methanol utilisation slow). Es wurden zwei *P. pastoris*-Stämme verwendet (siehe Tabelle 3). Der Stamm GS115 besitzt beide *AOX*-Gene und wächst damit auf Methanol wie der Wild-Typ (Mut^+). Beim Stamm KM71H ist das *AOX1*-Gen gegen das *ARG4*-Gen von *S. cerevisiae* ausgetauscht worden (*aox1::ARG4*-Gen) und es liegt der langsam wachsende Typ (Mut^S) vor (siehe auch 2.5 und 2.12.13).

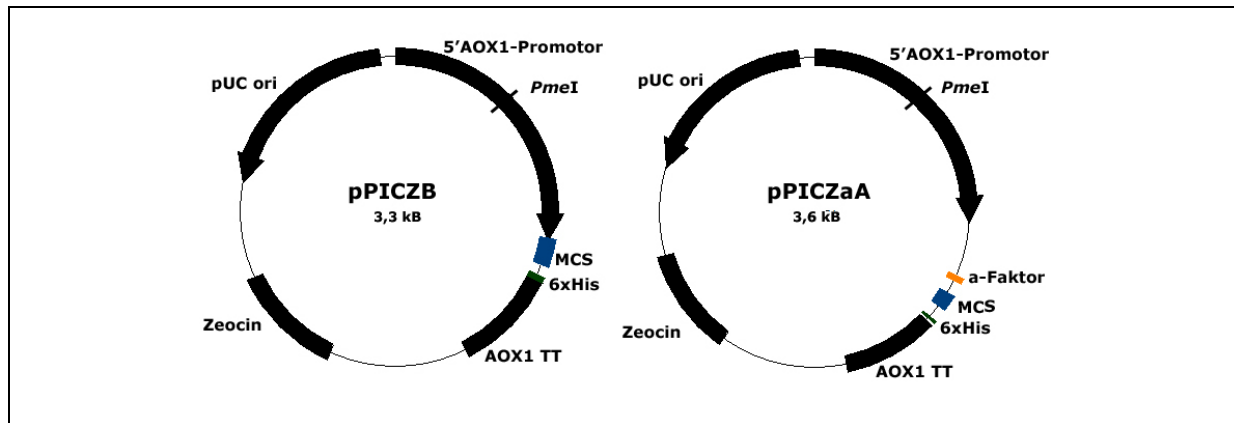


Abbildung 9: Schenkellvektoren pPICZB und pPICZαA zur Expression von heterologen Proteinen in *Pichia pastoris* (siehe Tabelle 4). Zeocin[®]-Resistenz, AOX1-Promotor, α-mating-Faktor: Sekretionssignal von *S. cerevisiae*, MCS: Multicloning-Site, AOX1 TT: Transcription-Termination-Region, pUC origin: Replikationsstartpunkt für Vervielfältigung in *E. coli*, Linearisierung durch *PmeI* im AOX1-Promotor.

Die Integration eines in der Promotorregion *AOX1* linearisierten Plasmids findet durch homologe Rekombination zwischen dem transformierten DNA-Plasmid und den homologen Regionen des *AOX1*-Promotors im Genom der Hefe statt. Dabei können 1-10% multiple Insertionen auftreten. Die Insertion entsteht durch eine „single crossover“ am *AOX1*-Promotor oder an der *AOX1*-Transcription-Termination-Region (TT). Die Vektoren werden „upstream“ oder „downstream“ am *AOX1*- oder am *aox1::ARG4*-Gen eingebaut. Beim KM71H-Stamm sind alle Transformanten Mut^S , da das *AOX1*-Gen zerstört ist (*aox1::ARG4*). Beim GS115-Stamm werden die linearisierten Konstrukte bevorzugt am *AOX1*-Locus (Promotor) integriert, d. h. die Transformanten sind Mut^+ . Es kann aber auch ein „double crossover“ zwischen dem *AOX1*-Promotor und der 3' *AOX1*-Region des Vektors und dem Genom erfolgen. Dabei wird der gesamte *AOX1*-Locus im Hefegenom durch das linearisierte Plasmid ersetzt (Genaustausch) und alle GS115-Transformanten sind Mut^S .

RNA-Gewinnung und Klonierung der PSAO in *Pichia pastoris*

Es wurde Gesamt-RNA aus den im Dunkeln gewachsenen oberirdischen Erbsensprossen gewonnen (siehe 2.10.1) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3.1).

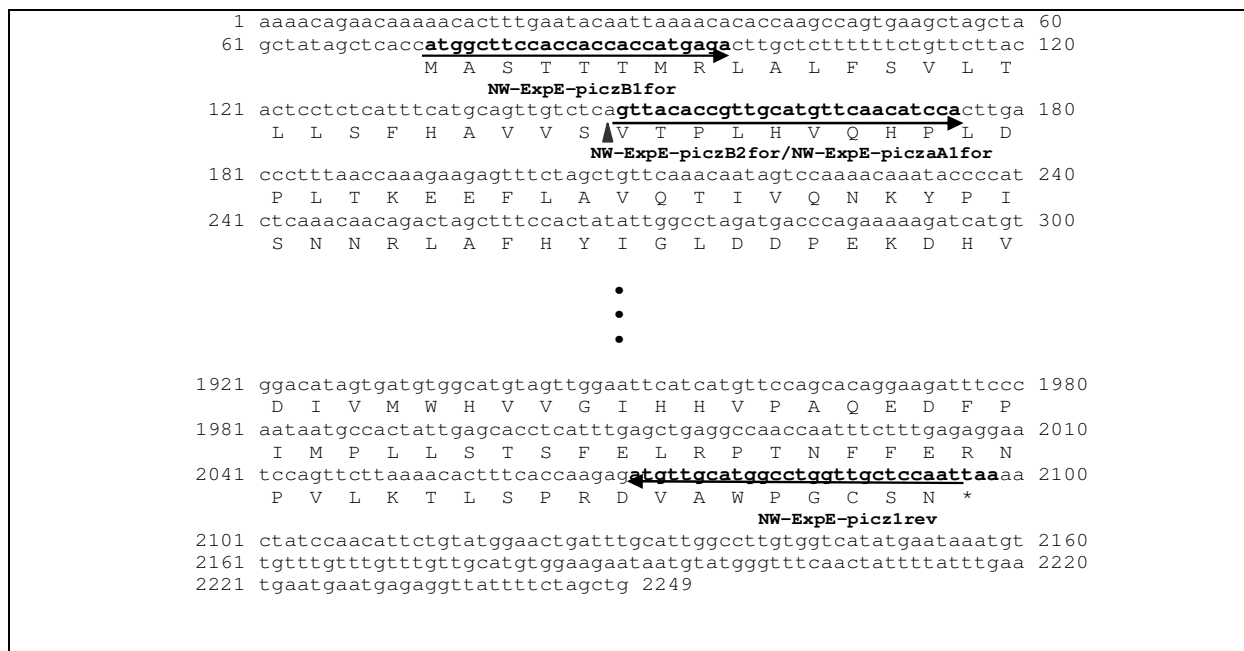


Abbildung 10: Nucleotid- und Aminosäuresequenz der PSAO von *Pisum sativum* nach Tipping and McPherson [1995], Lage der genspezifischen Expressionsprimer (siehe Tabelle 11) zur Expression in *P. pastoris* mit den Schaukelvektoren pPICZB und pPICZαA (siehe Abbildung 9), Pfeil: Signalpeptidsplattungsstelle.

Es lagen bis zu diesem Zeitpunkt keine Informationen über den Einfluss der Signalpeptidsequenz auf die Expression in *P. pastoris* im Institut vor. Deshalb wurden genspezifische Expressionsprimer für den pPICZB-Vektor (siehe Abbildung 10), der die intrazelluläre Expression von rekombinanten Proteine möglich macht, mit und ohne Signalpeptidsequenz der PSAO nach Tipping and McPherson [1995] entworfen. Die heterolog exprimierte PSAO könnte durch die PSAO-Signalpeptidsequenz aus der Hefe ins Kulturmedium exkretiert werden oder die Signalpeptidsequenz könnte die Expression eines funktionellen Proteins verhindern. Beim Entwurf dieser Primer musste beachtet werden, dass das Start-ATG sich in der Hefekonsensus-Sequenz (A/YAA/TAATGTCT) nach Romanos et al. [1992] befindet. Die cDNA musste in den Leserahmen des C-Terminus des Vektors kloniert werden. Es wurden die Primer NW-ExpE-piczb1for und NW-ExpE-piczb1rev zur Klonierung des offenen Leserahmens mit Signalpeptidsequenz für den pPICZB-Vektor entworfen. Für die Klonierung der PSAO ohne Signalpeptidsequenz in diesen Vektor wurden die beiden Primer NW-ExpE-piczb2for und ExpE-piczb1rev konstruiert. Die Primer NW-ExpE-piczb1for sowie NW-ExpE-piczb2for besitzen eine *SfiI*-Schnittstelle und der Primer NW-ExpE-piczb1rev eine *NotI*-Schnittstelle (siehe Tabelle 11). Für den pPICZαA-Vektor (siehe Abbildung 9), der ein Sekretionssignalpeptid des Hefe-α-Faktors von *S. cerevisiae* am N-Terminus der Multicloning-Site besitzt und für das Ausschleusen der rekombinanten Proteine aus den Hefezellen verantwortlich ist, wurden genspezifische Expressionsprimer ohne Signalpeptidsequenz der PSAO entworfen. Die cDNA musste hier in den Leserahmen des α-Faktors sowie des C-Terminus des Vektors kloniert werden. Das Start-ATG wurde durch den α-Faktor erzeugt. Für den pPICZαA-Vektor wurden die Primer NW-ExpE-piczaA1for mit einer *SfiI*-Schnittstelle und ExpE-piczb1rev mit einer *NotI*-Schnittstelle entworfen (siehe Tabelle 11).

Oligo-Peptid	Sequenz
NW-ExpE-piczaA1for für pPICZα-Vektor	5'-ATAA <u>GGCCCAGCCGGCC</u> A GTT ACA CCG TTG CAT GTT CAA CAT CCA-3'
	Expressionsprimer forward T_m : >75°C <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
NW-ExpE-picz1rev für pPICZα-Vektor + pPICZB-Vektor	5'-ATAT <u>GCGGCCGC</u> ATT GGA GCA ACC AGG CCA TGC AAC AT-3'
	Expressionsprimer reverse T_m : 74,9°C <i>Not</i> I-Schnittstelle
NW-ExpE-piczB1for für pPICZB-Vektor	5'-ATAA <u>GGCCCAGCCGGCC</u> A ATA ATG TCT ATG GCT TCC ACC ACC ACC ATG AGA-3'
	Expressionsprimer forward T_m : >75°C <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
NW-ExpE-piczB2for für pPICZB-Vektor	5'-ATAA <u>GGCCCAGCCGGCC</u> A ATA ATG TCT GTT ACA CCG TTG CAT GTT CAA CAT CCA-3'
	Expressionsprimer forward T_m : >75°C <i>Sfi</i> I-Schnittstelle

Tabelle 11: Genspezifische Expressionsprimer für die PSAO von *Pisum sativum* in *Pichia pastoris*. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Start-ATG fettgedruckt.

Mit Hilfe der *Pfx*-DNA-Polymerase wurde in einem 50 µl Ansatz eine PCR mit den Expressionsprimern (siehe Tabelle 11) durchgeführt.

95°C	5 min	} 34 x
95°C	45 sec	
68,5°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Nach Gelreinigung der drei Amplifikate (siehe 2.10.9.1) wurden diese und die Vektoren pPICZαA und pPICZB mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I nacheinander geschnitten (siehe 2.10.7), gereinigt und nach Ligation in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.10.8). Zur Linearisierung wurden positiv getestete Plasmide mit *Pme*I geschnitten und in kompetente KM71H- sowie GS115-Zellen transformiert (siehe 2.12.13). Die erhaltenen Klone wurden in YPG-Medium als Vorkultur angezogen und in BMMY-Medium als Hauptkultur mit 0,5% Methanol wurde die Expression der PSAO induziert (siehe 2.6 und 2.12.13). Die Expression wurde im Überstand sowie im Zellpellet nach bestimmten Zeitabständen mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft. Zudem wurden von Heferohextrakten Aktivitätstests durchgeführt. Trotzdem ein PCR-Screening von isolierter genomischer DNA aus Hefeklonen eine Integration der PSAO ins Genom der Hefe bewies, war keine Expression oder Aktivität der rekombinanten PSAO nachweisbar. Auch über eine His-Tag-Aufreinigung nach einer Expression unter Verwendung des pPICZαA-Vektors war keine Expression im SDS-PAGE-Gel in den Zellen sowie im Kulturüberstand nachzuweisen.

3.1.2. Tierische Aminoxidasen

Zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus von CAOs wurde eine käufliche tierische kupferhaltige Aminoxidase, die in der Literatur schon näher untersucht und charakterisiert worden ist, ausgewählt. Es handelt sich um eine Rinderplasma-Aminoxidase (BPAO). Durch die BPAO sollte eine leichtzulängliche Positivkontrolle etabliert werden, um so ein Referenzenzym zu den CAOs der PA-Pflanzen zu haben. Zur Untersuchung des BPAO-Reaktionsverhaltens wurde diese in einem Inkubationsansatz von 50 µl in einem Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2) mit Substrat inkubiert (siehe 2.15.7.2). Anschließend fand eine Reduktion mit Natriumborhydrid oder Alkoholdehydrogenase statt, um entstandene Carbonylgruppen zu Hydroxylgruppen zu reduzieren (siehe Abbildung 2) und um ungeladene Produkte statt eines möglichen Iminiumions zu erhalten (siehe 3.8.2 - Positivkontrollassay – tierische Aminoxidasen).

Polyamine werden durch die BPAO nach Lee und Sayre [1998] an der primären Aminogruppe oxidiert. Aus Homospermidin wird 4-(4-Aminobutylamino)butanal. Dieses befindet sich im Gleichgewicht mit einem zyklischen Iminiumion. Erst wenn das Ausgangssubstrat vollständig umgesetzt wurde, findet eine Oxidation an der zweiten Aminogruppe statt (siehe Abbildung 11). Wenn eine Oxidation durch die BPAO an der sekundären Aminogruppe stattfinden würde, entstünde neben Putrescin auch 4-Aminobutanal bzw. 1-Pyrrolin.

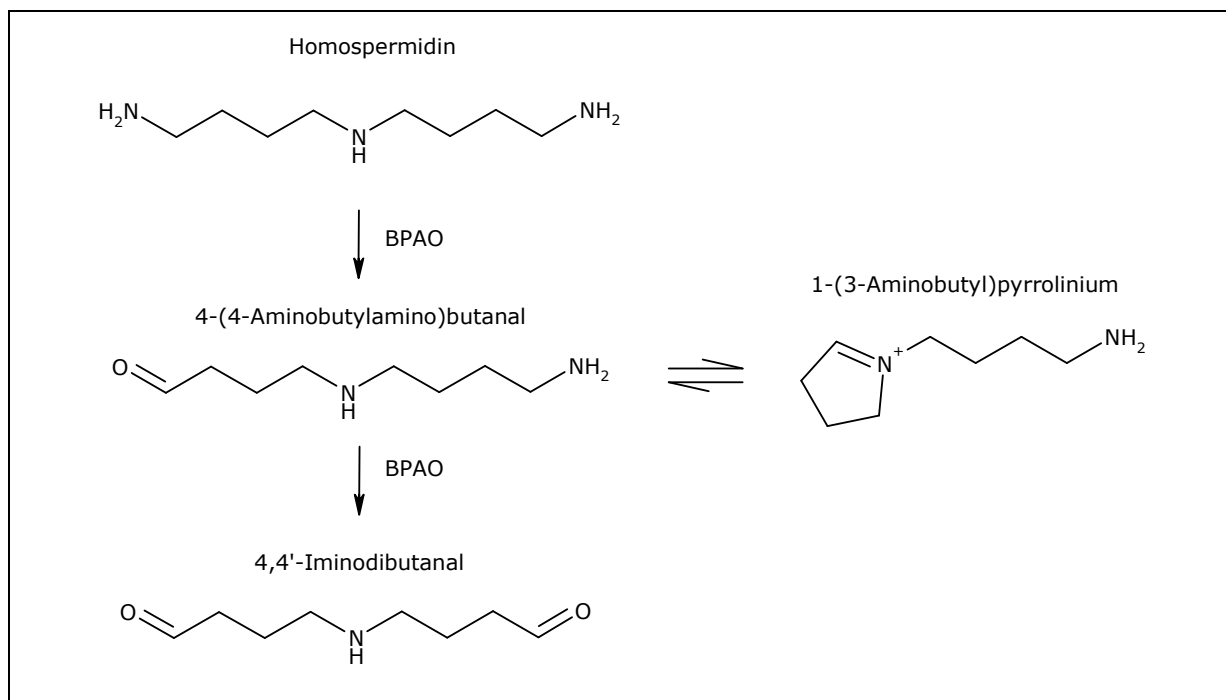


Abbildung 11: Reaktion einer Rinderplasma-Aminoxidase (BPAO) mit Homospermidin nach Lee und Sayre [1998].

Spermidin wird nach Houen et al. [1994] durch eine Rinderserum-Aminoxidase (BSAO), die zur Familie der CAOs gehört, an der sekundären Aminogruppe zu Acrolein und Putrescin oxidiert. Neuere Untersuchungen widersprechen diesen Ergebnissen. Nach Houen et al. [2005] findet die Oxidation

durch eine BSAO an der primären Aminogruppe statt. Es entsteht der Aminoaldehyd (siehe Abbildung 12).

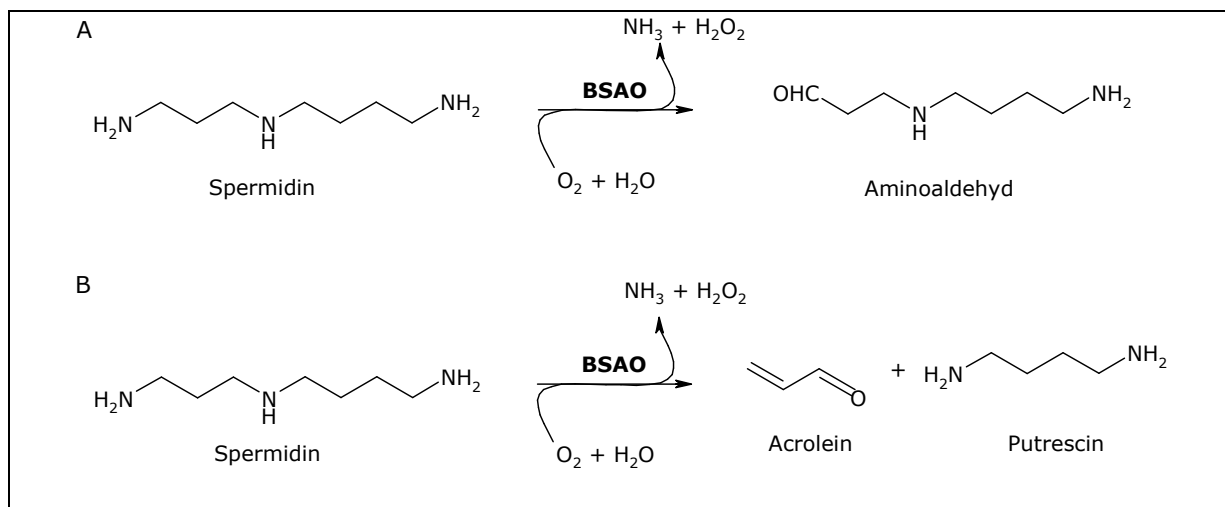


Abbildung 12: Mögliche Reaktionen einer Rinderserum-Aminoxidase (BSAO) mit Spermidin

A: nach Houen et al. [2005], B: nach Houen et al. [1994]

Bei den durchgeführten Inkubationen zeigte sich, dass mindestens eine Unit des Enzyms eingesetzt werden muss, um einen Umsatz zu erhalten. Bei zusätzlicher Gabe von [^{12}C]Substrat zum Inkubationsansatz konnte kein Umsatz mehr festgestellt werden.

3.1.2.1. Inkubation der BPAO mit [^{14}C]Homospermidin

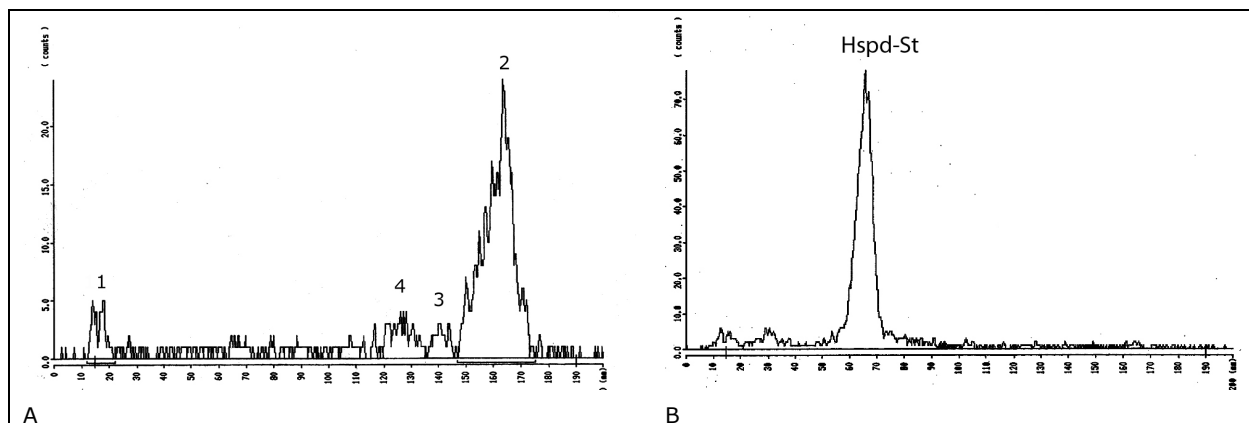


Abbildung 13: Chromatogramm einer BPAO-Inkubation mit [^{14}C]Homospermidin.

A: Inkubation bei 30°C für 20 Stunden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,2) mit 1 Unit BPAO und 2 U Catalase in einem 50 μl Inkubationsansatz, vor einer Reduktion mit Natriumborhydrid oder Alkoholdehydrogenase. Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC-Platte aufgetragen, die Auftrennung erfolgte im Polyamin-FM und die Detektion durch das RITA-System. Produkte 1-4 siehe Tabelle 12 und Tabelle 13; B: Homospermidin-Standard.

Die erhaltenen Messwerte der zwei Bestimmungen aus Tabelle 12 und Tabelle 13 (ohne Reduktion mit Alkoholdehydrogenase oder Natriumborhydrid) zeigten große Schwankungen. Die Enzymaktivität mit Homospermidin als Substrat war nicht sehr hoch, da erst nach einer Inkubation von mindestens zwei Stunden ein Umsatz zu drei Produkten nachweisbar war. Auch war die Enzymaktivität bei der 30°C-Inkubation im Vergleich zur 22,5°C-Inkubation nicht wesentlich erhöht. Der Einsatz eines chemischen Reduktionsmittels oder einer Alkoholdehydrogenase zeigte keinen Unterschied im

erhaltenen Peakspektrum, so dass in den weiteren Versuchen darauf verzichtet wurde. Das Hauptprodukt war das Produkt 2 (R_f -Wert: 0,86). Die Bildung von Putrescin und 1-Pyrrolin konnte ausgeschlossen werden, da der Putrescin-Standard einen R_f -Wert von 0,6 besaß und Putrescin durch die BPAO unter diesen Inkubationsbedingungen nicht oxidiert (siehe 3.1.2.3) wurde. Danach wurde Homospermidin durch die BPAO wahrscheinlich an der primären Aminogruppe oxidiert. Lee und Sayre [1998] führten nach der Reduktion eine Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid durch, um die entstandenen Produkte ihrer Inkubationen mit der NMR-Spektrometrie zu untersuchen. Sie konnten nur Homospermidin und 1-(4-Acetamidobutyl)pyrrolidin nachweisen. Die hier entstandenen Peaks müssen noch weiter untersucht werden. Es könnten die Verbindungen aus Abbildung 11 entstanden sein.

30°C pH-Wert 7,2		Hspd R_f-Wert: 0,21	Produkt 1 R_f-Wert: 0,02	Produkt 2 R_f-Wert: 0,86	Produkt 3 R_f-Wert: 0,74	Produkt 4 R_f-Wert: 0,64
2 h vor Reduktion	a)	44%	56%	-	-	-
	b)	31%	10%	58%	-	-
2 h nach Reduktion	a)	11%	20%	33%	36%	-
	b)	12%	14%	29%	45%	-
4 h vor Reduktion	a)	12%	14%	29%	45%	-
	b)	15%	13%	72%	-	-
4 h nach Reduktion	a)	9%	15%	30%	43%	-
	b)	-	25%	47%	29%	-
20 h vor Reduktion	a)	-	8%	72%	7%	14%
	b)	-	26%	46%	-	27%

Tabelle 12: Inkubation einer BPAO mit [14 C]Homospermidin bei 30°C nach Lee und Sayre [1998]. Die Inkubation erfolgte in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,2) für 2, 4 und 20 Stunden mit 1 Unit BPAO und 2 U Catalase in einem 50 µl Inkubationsansatz. Von der Probe wurden 10 µl vor und nach der Reduktion mit Natriumborhydrid (siehe 2.15.7.2 und 2.16.1) auf eine DC-Platte aufgetragen und anschließend im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte durch das RITA-System. Die Flächenverteilung in % von zwei Inkubationen ist dargestellt: a) mit anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid; b) ohne anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid. Die Hauptprodukte sind fettgedruckt markiert.

22,5°C pH-Wert 7,2		Hspd R_f-Wert: 0,21	Produkt 1 R_f-Wert: 0,02	Produkt 2 R_f-Wert: 0,86	Produkt 3 R_f-Wert: 0,75	Produkt 4 R_f-Wert: 0,64
2 h vor Reduktion	a)	29%	23%	20%	29%	-
	b)	86%	14%	-	-	-
2 h nach Reduktion	a)	-	17%	48%	35%	-
	b)	10%	11%	43%	36%	-
4 h vor Reduktion	a)	33%	9%	59%	-	-
	b)	-	23%	51%	26%	-
20 h vor Reduktion	a)	-	16%	47%	29%	-
	b)	-	9%	91%	-	-
20 h nach Reduktion	a)	-	23%	19%	35%	16%

Tabelle 13: Inkubation der BPAO mit [14 C]Homospermidin bei 22,5°C nach Lee und Sayre [1998]. Die Inkubation erfolgte in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,2) für 2, 4 und 20 Stunden mit 1 Unit BPAO und 2 U Catalase in einem 50 µl Inkubationsansatz. Von der Probe wurden 10 µl vor und nach der Reduktion mit Natriumborhydrid (siehe 2.15.7.2 und 2.16.1) auf eine DC-Platte aufgetragen und anschließend im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte durch das RITA-System. Die Flächenverteilung in % von zwei Inkubationen ist dargestellt: a) mit anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid; b) ohne anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid. Die Hauptprodukte sind fettgedruckt markiert.

3.1.2.2. Inkubation der BPAO mit [^{14}C]Spermidin

Es sind vier Substanzen bei der Umsetzung der BPAO mit Spermidin entstanden (siehe Abbildung 14). Der Putrescin-Standard hatte einen R_f -Wert von 0,60. Deshalb konnte das Produkt 3 als Putrescin identifiziert werden. Dies spricht für eine Oxidation von Spermidin durch die BPAO an der sekundären Aminogruppe (siehe Abbildung 12 B). Diese Daten widersprechen den Untersuchungen nach Houen et al. [2004] und würden mit den Ergebnissen nach Houen et al. [1994] übereinstimmen. Die erhaltenen Messwerte zeigten große Schwankungen (siehe Tabelle 14).

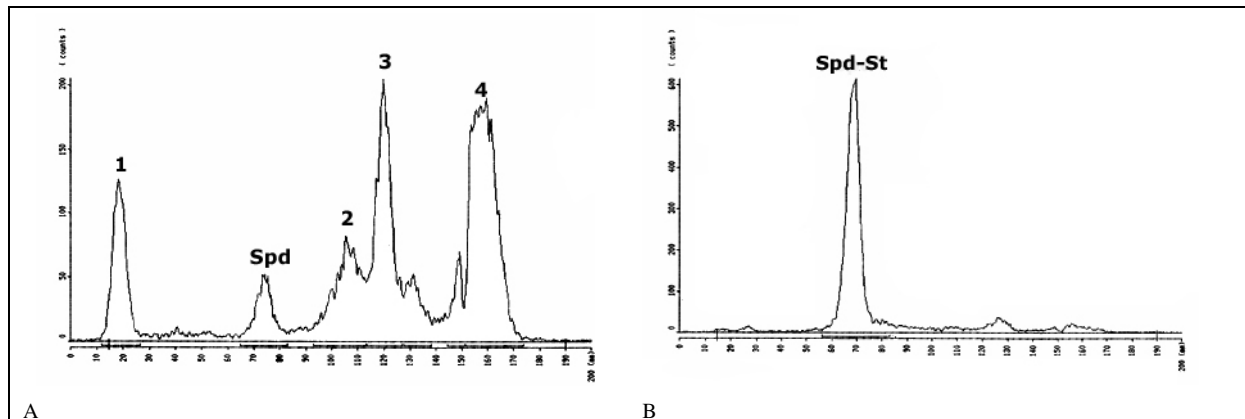


Abbildung 14: Chromatogramm einer BPAO-Inkubation mit [^{14}C]Spermidin nach Lee und Sayre [1998], A: Inkubation bei 30°C für 1 Stunde in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert: 7,2) mit 1 Unit BPAO und 1,4 U Catalase in einem 50 μl Ansatz und ohne eine anschließende Reduktion durch Natriumborhydrid. Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC-Platte aufgetragen, im Polyamin-FM aufgetrennt und die Detektion erfolgte durch das RITA-System (siehe 2.15.7.2 und 2.16.1), Produkte 1-4 siehe Tabelle 14. B: Spermidin-Standard.

30°C pH-Wert 7,2	Spd R_f -Wert: 0,29	Produkt 1 R_f -Wert: 0,02	Produkt 2 R_f -Wert: 0,55	Produkt 3 R_f -Wert: 0,60	Produkt 4 R_f -Wert: 0,85
a) 1 h	8%	-	75%	-	17%
b) 1 h	6%	12%	14%	22%	43%
c) 1h + HEH	44%	4%	-	36%	17%
a) 2 h	36%	26%	24%	15%	16%
b) 2 h	3%	11%	17%	23%	37%
c) 2h + HEH	40%	-	-	27%	22%
a) 3 h	-	10%	23%	29%	31%
c) 3h + HEH	57%	-	-	43%	-
a) 4 h	25%	10%	28%	14%	23%
b) 4 h	-	7%	42%	38%	12%
c) 4h + HEH	70%	-	-	30%	-
a) 5 h	6%	-	58%	36%	-
c) 5h + HEH	100%	-	-	-	-
a) 20 h	43%	-	57%	-	-

Tabelle 14: Drei BPAO-Inkubationen mit [^{14}C]Spermidin nach Lee und Sayre [1998]

Die Inkubation erfolgte für 1, 2, 3, 4, 5 und 20 h bei 30°C in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7,2) mit 1 Unit BPAO und 1,4 U Catalase in einem 50 μl Ansatz ohne eine anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid. Die Inkubation c) erfolgte mit 1 mM Hemmstoff HEH. 10 μl Probe wurde auf eine DC-Platte aufgetragen, im Polyamin-FM entwickelt und mit dem RITA-System detektiert. Dargestellt ist die Flächenverteilung der Peaks in % (siehe Abbildung 14) und das Hauptprodukt ist fettgedruckt.

Eine Hemmung durch HEH, einem Hemmstoff der CAO, war möglich (siehe Tabelle 14). Dies spricht für eine Umsetzung durch eine CAO (siehe 1.3). Die entstandenen Substanzen müssten noch identifiziert werden, um genauerer Aussagen über den Reaktionsmechanismus machen zu können. Dies war jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

3.1.2.3. Inkubation der BPAO mit [^{14}C]Putrescin

Bei Inkubationen der BPAO mit [^{14}C]Putrescin (siehe 2.15.7.2) konnte kein Umsatz nachgewiesen werden. Dabei wurde der pH-Wert des Puffers im Bereich 5-9 variiert und bis zu 20 Stunden inkubiert.

3.1.2.4. Zusammenfassung der Inkubationen mit der BPAO

Das Verhalten der BPAO in Bezug auf Polyamine war nicht eindeutig. Homospermidin wurde möglicherweise an der primären Aminogruppe und Spermidin an der sekundären Aminogruppe oxidiert. Auch waren die Inkubationen nicht reproduzierbar, denn die erhaltenen Messwerte zeigten große Schwankungen. Bei manchen Inkubationen erfolgte kein Umsatz. Die BPAO eignet sich somit nicht als Positivkontrolle für Aktivitätsmessungen.

3.2. Charakterisierung von CAO-Aktivitäten in verschiedenen Pflanzen

3.2.1. PSAO aus *Pisum sativum*-Rohextrakten

Um das Verhalten einer Primärstoffwechsel-CAO in pflanzlichen Rohextrakten besser kennen zu lernen, wurden Erbsen-Rohextrakte (siehe Positivkontrollassay - Erbsenrohextrakte- 3.8.2.4) mit verschiedenen Polyaminen inkubiert und mit Hilfe der Radio-DC untersucht (siehe 2.15.6).

Im Primärstoffwechsel von Pflanzen wird Putrescin von CAOs zu 4-Aminobutanal oxidiert (siehe Abbildung 15). Dieses Produkt reagiert spontan durch Wasserabspaltung zu 1-Pyrrolin. Durch die Pyrrolindehydrogenase (PDH) wird 1-Pyrrolin in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion zu γ -Aminobuttersäure (GABA) oxidiert. Durch die 4-Aminobuttersäure-Aminotransferase (EC 2.6.1.19) wird GABA zu Succinat abgebaut. Ein irreversibler Hemmstoff für die 4-Aminobuttersäure-Aminotransferase ist Gabaculin (GCU) [Flores und Filner, 1985].

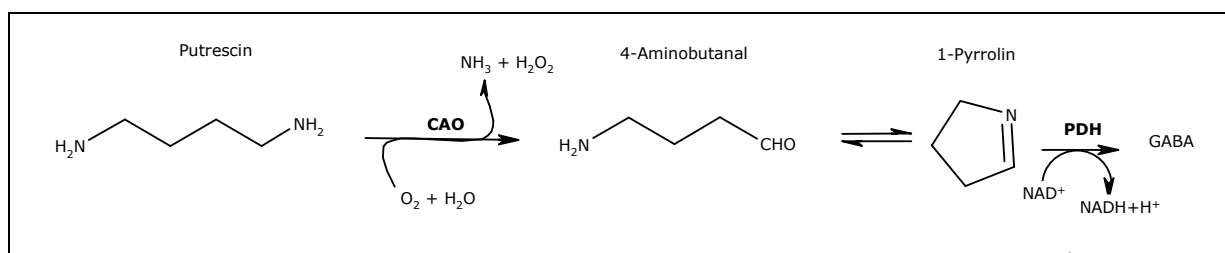


Abbildung 15: Funktion pflanzlicher CAOs im Primärstoffwechsel – Putrescin wird durch eine CAO zu 4-Aminobutanal oxidiert und durch Zyklisierung entsteht 1-Pyrrolin, das nachfolgend durch die Pyrrolindehydrogenase (PDH) in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion zu GABA oxidiert wird.

3.2.1.1. Inkubation von Erbsenrohextrakten mit [^{14}C]Putrescin

Die Untersuchung des Verhaltens der PSAO (CAO von *Pisum sativum*) in Rohextrakten, hergestellt aus 10 Tage alten, im Dunkeln angezogenen Erbsenkeimlingen, mit [^{14}C]Putrescin erfolgte durch Inkubationen bei 37°C für 5 min bis 1 Stunde ohne weitere Zusätze (siehe 2.15.6). Anschließend wurde der Umsatz mit der Radio-Dünnschichtchromatographie untersucht (siehe 2.16.1). Es waren zwei Hauptsubstanzen entstanden (siehe Abbildung 16).

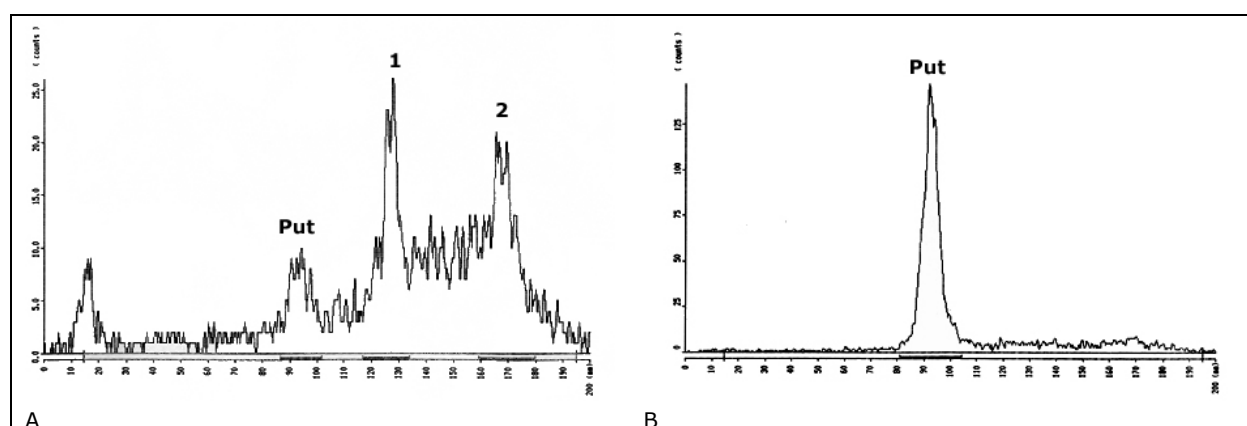


Abbildung 16: Chromatogramm einer Inkubation eines Erbsenrohextraktes mit [^{14}C]Putrescin.

A: Die Inkubation eines Erbsenrohextraktes mit [^{14}C]Putrescin nach Umpufferung auf Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH-Wert 7) erfolgte bei 37°C für fünf Minuten. Anschließend wurden 10 μl Reaktionsansatz auf eine DC-Platte aufgetragen, im Polyamin-FM aufgetrennt (siehe 2.16.1) und durch das RITA-System detektiert. B: gleicher Ansatz wie A nur mit 1 mM HEH-Zusatz. Die R_f -Werte der Peaks sind in Tabelle 15 dargestellt.

Um die Eigenschaften der PSAO näher zu untersuchen und zur Identifizierung von Produktpeaks, wurden die Inkubationen mit einigen Zusätzen wiederholt. Der Rohextrakt wurde mit 1,6 mM [^{12}C]Putrescin versetzt, um eine Enzymaktivität zu bestimmen. Dabei war nach 10 min das gesamte Substrat abgebaut ($0,005 \mu\text{mol/min} \rightarrow 0,2 \text{ U/ml}$). Es wurde 1 mM HEH zugefügt, um zu bestätigen, dass die Reaktion durch eine CAO bzw. Polyaminoxidase entstanden ist. Bei HEH-Zusatz ließ sich kein Umsatz nachweisen, so dass ein HEH-hemmbares Enzym für den Abbau von Putrescin verantwortlich war (siehe Tabelle 15).

Inkubationsansatz Erbsenrohextrakt	Putrescin R_f -Wert 0,53	Verbindung 1 R_f -Wert 0,72	Verbindung 2 R_f -Wert 0,88
+ [^{14}C]Putrescin	-	66%	34%
+ [^{14}C]Putrescin + 95°C für 5 min	100%	-	-
+ [^{14}C]Putrescin + 1 mM HEH	100%	-	-
+ [^{14}C]Putrescin + 1 mM NAD^+	-	100%	-
+ [^{14}C]Putrescin + 1 mM Gabaculin	-	66%	34%

Tabelle 15: R_f -Werte sowie prozentuale Verteilung von entstandenen Peaks bei Inkubationen mit Erbsenrohextrakten mit [^{14}C]Putrescin (siehe Abbildung 16) bei 37°C für 30 min mit verschiedenen Zusätzen in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7). Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC-Platte aufgetragen, die Auftrennung erfolgte im Polyamin-FM und die Detektion durch das RITA-System (siehe 2.16.1).

1 mM NAD^+ und 1 mM Gabaculin (Hemmstoff der 4-Aminobuttersäure-Aminotransferase) wurden in den Inkubationsansatz gegeben, um den Abbau von GABA zu hemmen und somit GABA zu akkumulieren. Bei einem NAD^+ -Zusatz entsteht zu 100% die Verbindung 1, während ohne weitere

Zusätze ein Gemisch aus zwei Produkten entsteht (siehe Tabelle 15). Der Gabaculin-Zusatz hatte keinen Einfluss auf die prozentuale Verteilung der Radioaktivität, so dass keiner der entstandenen Peaks als Succinat identifiziert werden konnte. Da in einem Rohextrakt eine Vielzahl von Enzymen vorliegen, können auch andere Enzyme an den Umsätzen beteiligt gewesen sein. Um weitere Hinweise auf die hier entstandenen Substanzen zu erhalten, wurde eine käufliche Diaminoxidase der Schweineniere (siehe 3.8.2.5) mit [^{14}C]Putrescin inkubiert und mit der Dünnschichtchromatographie untersucht (siehe 2.16.1). Es waren auch die beiden Hauptpeaks entstanden. Dies würde darauf deuten, dass die Substanz mit dem R_f -Wert von 0,72 möglicherweise 1-Pyrrolin ist (siehe Tabelle 53). In dem Schweinenieren-DAO-Ansatz waren im Vergleich zum Erbsenrohextrakt keine weiteren Enzyme vorhanden, die 1-Pyrrolin abbauen können. Ein GABA-Standard hatte nach Ninhydrin-Detektion einen R_f -Wert von 0,62 im Polyamin-Fließmittel. Die zweite Substanz konnte nicht identifiziert werden. Zur eindeutigen Identifikation der Produkte sind GC-MS-Untersuchungen notwendig.

3.2.1.2. Inkubation von Erbsenrohextrakten mit [^{14}C]Spermidin

Zur Untersuchung der Enzymaktivitäten eines pflanzlichen Rohextraktes mit [^{14}C]Spermidin wurden Inkubationen mit Erbsenrohextrakten, hergestellt aus 10 Tage im Dunkeln angezogenen Erbsen, durchgeführt. Neben einer CAO sind in pflanzlichen Rohextrakten Polyaminoxidasen (PAO) enthalten. Sie katalysieren die Spaltung von Spermidin an der sekundären Aminogruppe zu 1-Pyrrolin und Diaminopropan (siehe Abbildung 17) [Tiburcio et al., 1997]. Eine CAO oxidiert in Pflanzen Putrescin zu 1-Pyrrolin [Cona et al., 2006]. Das 1-Pyrrolin wird anschließend zu GABA und Succinat abgebaut (siehe 3.2.1.1).

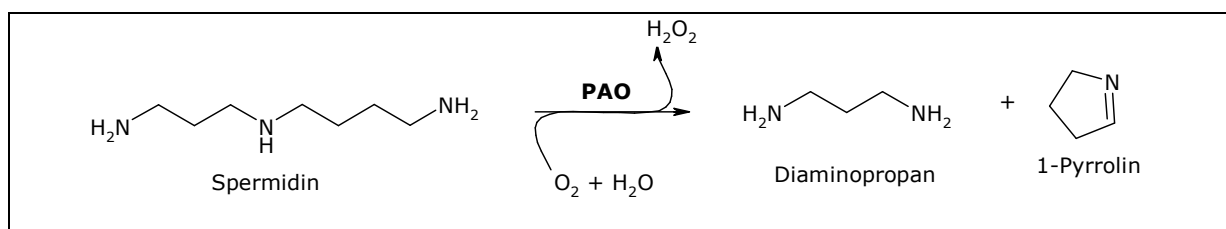


Abbildung 17: Spermidin-Oxidation durch eine PAO

Bei Inkubationen von *P. sativum*-Rohextrakten mit [^{14}C]Spermidin bei 37°C ohne weitere Zusätze (siehe 2.15.6) wurde ein Endprodukt nach 60 min erhalten (siehe Tabelle 16). Es entstand ein Zwischenprodukt.

Inkubationsansatz Erbsenrohextrakt + [^{14}C]Spermidin	Spermidin R_f -Wert 0,32	Verbindung 1 R_f -Wert 0,69	Verbindung 2 R_f -Wert 0,88
15 min	20-30%	<25%	40%
60 min	< 20%	-	80-100%

Tabelle 16: Inkubation von ungepufferten Erbsenrohextrakten mit [^{14}C]Spermidin in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7) bei 37°C für 15 und 60 min, von der Probe wurden 10 μl auf eine DC aufgetragen, die Auftrennung erfolgte mit dem Polyamin-FM (siehe 2.16.1) und die Detektion durch das RITA-System. Dargestellt sind die R_f -Werte sowie prozentuale Verteilung von entstandenen Produkten.

Bei den beiden Verbindungen könnte es sich um Diaminopropan, 1-Pyrrolin, GABA oder Succinat handeln. Welche Substanzen entstanden waren, konnte hier durch die Dünnschichtchromatographie nicht geklärt werden.

3.2.1.3. Inkubation von Erbsenrohextrakten mit [^{14}C]Homospermidin

In Erbsenrohextrakten sind neben den CAOs Polyaminoxidasen (PAOs) vorhanden. Homospermidin würde durch eine PAO an der sekundären Aminogruppe in 1-Pyrrolin und Diaminobutan (Putrescin) gespalten (siehe Abbildung 18). Bei einer Umsetzung durch ein CAO würden die Produkte aus Abbildung 11 entstehen.

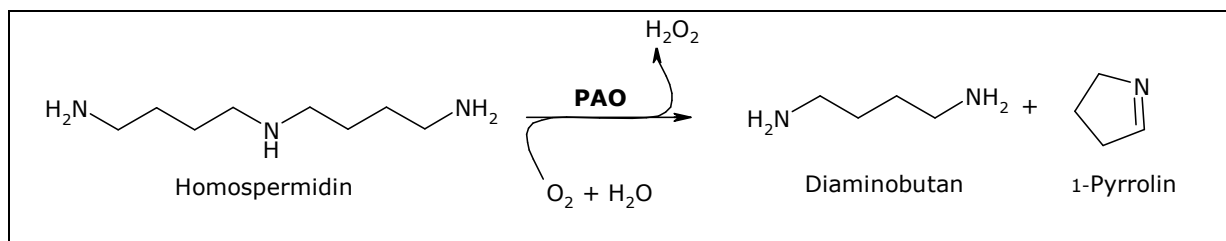


Abbildung 18: Reaktion einer PAO mit Homospermidin.

Es wurden Inkubationen mit Erbsenrohextrakten, hergestellt aus 10 Tage alten, im Dunkeln angezogenen Erbsen, mit [^{14}C]Homospermidin bei 37°C ohne weitere Zusätze durchgeführt. Nach vier sowie nach 20 Stunden wurden Proben genommen (siehe 3.8.2) und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht (siehe 2.16.1). Es war kein Umsatz feststellbar. Erst nach dem Zusatz von der wasserstoffperoxidabbauenden Catalase war nach mehr als vier Stunden ein Umsatz messbar (siehe Tabelle 17 und Abbildung 19). Ein zusätzlicher Zusatz von einer Alkoholdehydrogenase (ADH) zur Reduktion von Substanzen zum Inkubationsansatz veränderte das Ergebnis nicht. Ein Zusatz des Hemmstoffes HEH in einer Konzentration von 1 mM im Inkubationsansatz zeigte, dass die Aktivität auf ein HEH-hemmbares Enzym zurückzuführen war, da kein Umsatz nachweisbar war (Erläuterungen siehe auch Etablierung eines Assays - 3.8.2.4).

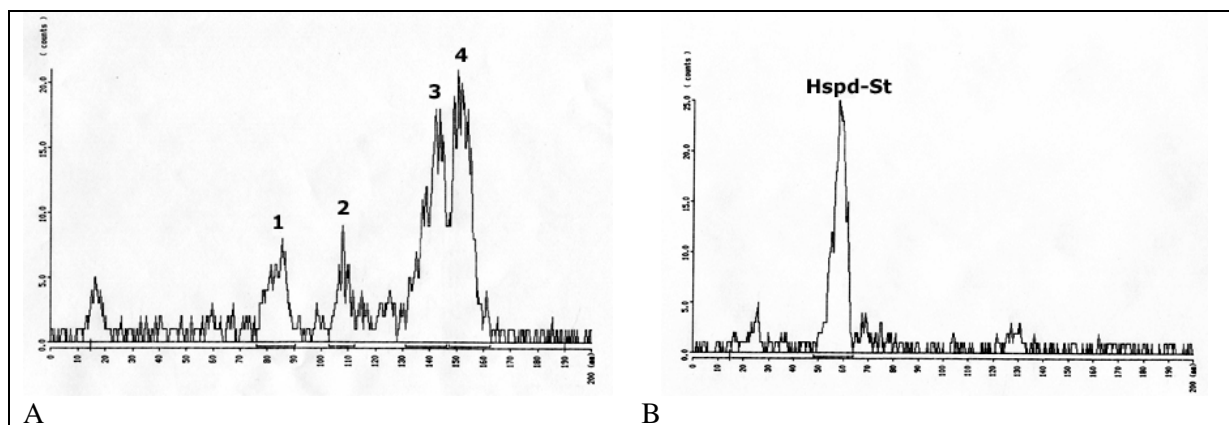


Abbildung 19: Chromatogramm einer Inkubation eines *Pisum sativum*-Rohextraktes mit [^{14}C]Hspd.

A: Die Inkubation eines umgepufferten Erbsenrohextraktes (0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7 mit 2 mM DTT, 70 μl Inkubationsansatz)) erfolgte mit 0,3 U/ μl Catalase, 0,2 U/ μl ADH und 1 mM NADH bei 30°C für 4 Stunden. Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC-Platte aufgetragen, im Polyamin-FM aufgetrennt (siehe 2.16.1.2) und die Detektion erfolgte durch das RITA-System; B: [^{14}C]Homospermidin-Standard.

Inkubationszeit	Hspd R _f -Wert 0,30	Produkt 1 R _f -Wert	Produkt 2 R _f -Wert	Produkt 3 R _f -Wert	Produkt 4 R _f -Wert
4 h/20 h	-	0,38	0,54	0,75	0,81

Tabelle 17: R_f-Werte der entstandenen Peaks einer *Pisum sativum*-Rohextraktinkubation mit [¹⁴C]Homospermidin nach 4 h bzw. 20 h Inkubation bei 30°C. Gemessen nach Auftrennung im Polyamin-FM und Detektion durch das RITA-System (siehe Abbildung 19). Es waren nach 20 Stunden Inkubation dieselben Peaks wie nach 4 Stunden Inkubation vorhanden.

Mehrere weitere Parameter wurden variiert, um deren Einfluss auf den Umsatz zu testen. Es wurden Inkubationen bei einem pH-Wert von 7 und 8 durchgeführt, die Inkubationstemperatur betrug 30 bzw. 37°C. Auch wurde das Pflanzenmaterial unter Stickstoffkühlung sowie auf Eiskühlung fein zerkleinert, um den Rohextrakt herzustellen, um den Einfluss der Temperatur während der Extrakterstellung auf den Umsatz zu untersuchen. Zudem wurde der Anteil der Zusätze der Catalase (0,03 U/μl), und ADH (0,01 U/μl) reduziert. Das erhaltene Peakspektrum ist gleich geblieben (siehe Abbildung 19). Nur die Substanzen waren in anderen Verhältnissen entstanden. Durch Zugabe von [¹²C]Homospermidin zum Inkubationsansatz zeigte sich, dass das Produkt 1 als erstes gebildet wird. Nach weiterer Inkubation wurde dieses in die Produkt 3 und Produkt 4 umgewandelt. Das Produkt 2 war ein Nebenprodukt (siehe Tabelle 17). Welche Substanzen entstanden waren und welche Enzyme daran beteiligt waren, konnte durch die R_f-Werte von Standards nicht geklärt werden.

3.2.1.4. Zusammenfassung - Inkubation von Erbsenrohextrakten

Nach den Inkubationen der Erbsenrohextrakte mit Putrescin, Spermidin und Homospermidin zeigte sich, dass die Aktivität gegenüber Homospermidin sehr gering war. Erst durch Zusatz von Catalase zum Abbau von Wasserstoffperoxid, war ein Umsatz zu messen. Wie erwartet, erfolgte der Putrescinumsatz schneller als der von Spermidin.

3.2.2. CAOs aus *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten

Zur Gewinnung von Erkenntnissen über die Eigenschaften des Homospermidin-umsetzenden Enzyms in den PA-produzierenden Pflanzen *S. vernalis* und *E. cannabinum* wurden mit umgepufferten Wurzelorgankulturohextrakten Inkubationsversuche durchgeführt (siehe auch 3.8.2.6 - Inkubationen mit Wurzelorgankulturohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum*).

Es wurde postuliert, dass Homospermidin durch eine CAO an der primären Aminogruppe zum Aldehyd oxidiert wird und anschließend durch eine Mannich-Kondensationsreaktion zum Iminiumion reagiert (siehe Abbildung 20 und Einleitung - 1.3). Nach Bildung des 1-Formylpyrrolizidins findet eine Reduktion zum 1-Hydroxymethylpyrrolizidin, dem Necinbase-Grundkörper, statt. Dies wurde durch einen Inkubationsversuch mit der „Diaminoxidase“ der Erbse bestätigt. Nach einer Woche Inkubation der Diaminoxidase mit Homospermidin, einer Alkoholdehydrogenase und einer Catalase wurde Trachelanthamidin mit einer Ausbeute von 21,8% erhalten [Robins, 1982].

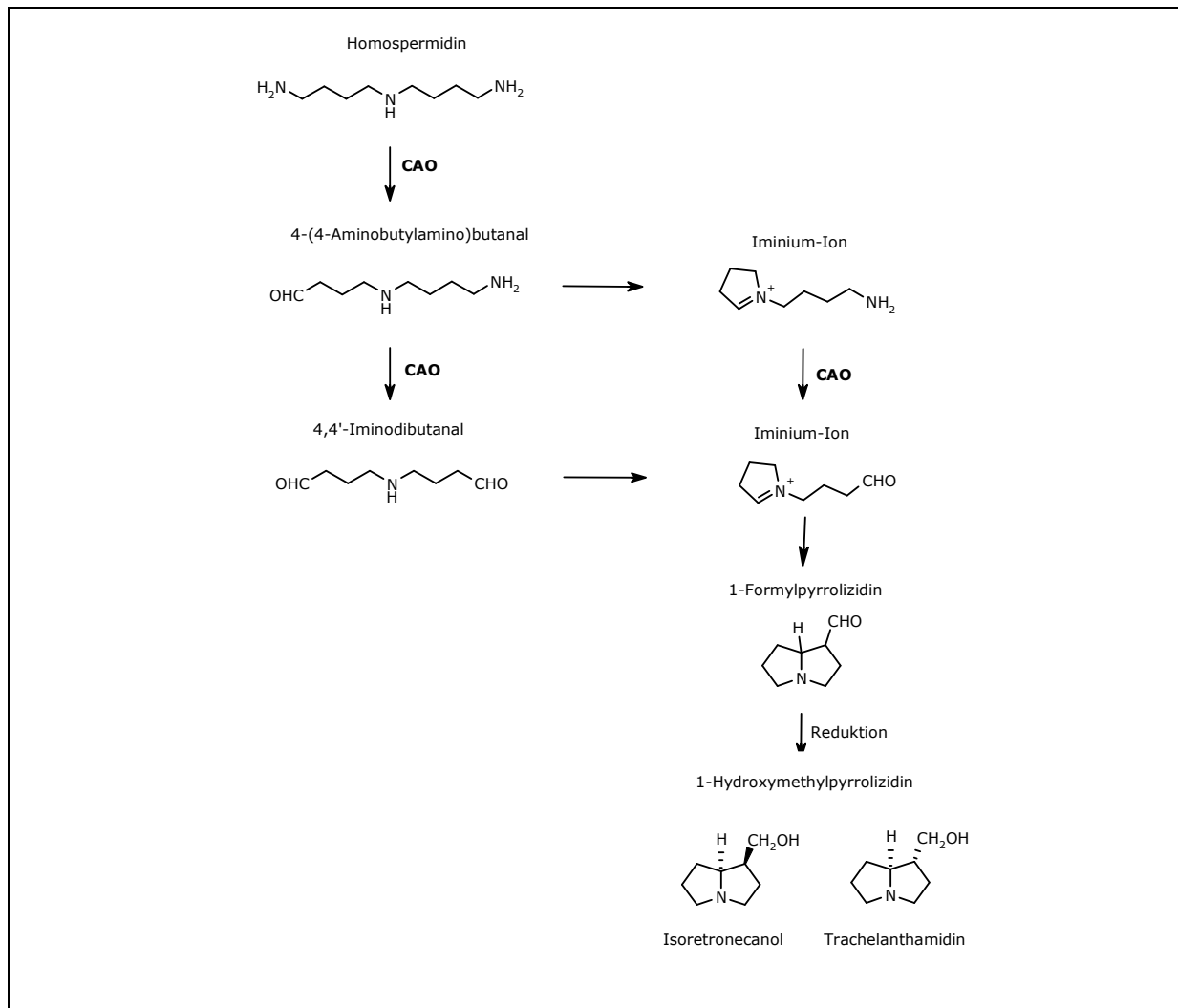


Abbildung 20: Möglicher Biosyntheseweg des Necinbase-Grundkörpers der PAs nach Robins [1982].

3.2.2.1. Wurzelrohextraktinkubationen von *E. cannabinum* und *S. vernalis* mit [^{14}C]Homospermidin

Es wurden enzymatische Aktivitäten in umgepufferten 3 Tage sowie 10 Tage alten Wurzelorgankulturohextrakten von *E. cannabinum* bzw. *S. vernalis* gegenüber [^{14}C]Homospermidin als Substrat getestet. Die Inkubationen erfolgten bei 30°C bzw. 37°C mit 0,3 U/ μl Catalase, 0,1 U/ μl Alkoholdehydrogenase (ADH) und 1 mM NADH in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7 mit 2 mM DTT) in einem Maximalvolumen von 70 μl für eine bis 20 Stunden (siehe 3.8.2.6). Es wurden drei Produkte bei *E. cannabinum* und vier Produkte bei *S. vernalis* gemessen (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19). Die Bildung von Putrescin konnte durch Standards ausgeschlossen werden.

Es wurden einige Parameter, die einen Einfluss auf die Proteinstabilität haben können, variiert. Es zeigte sich, dass die Inkubationstemperatur, die Lagerung des Rohextraktes bei -20°C für vier Tage, das Alter der Pflanzen und die Extraktionsmethode der Proteine (Zerkleinerung des Pflanzenmaterials unter Eiskühlung oder Kühlung mit flüssigem Stickstoff) keinen Einfluss auf die entstehenden Produkte hatten.

Nach Hill [1972] liegt das pH-Optimum der Primärstoffwechsel-CAO von *P. sativum* bei 7. Bei der CAO von *Hordeum vulgare*-Keimlingen wurde ein Optimum von 7,5 gemessen [Cogoni et al., 1990]. Nach Böttcher et al. [1994] hat die HSS von *E. cannabinum* ein Optimum bei pH-Wert 9. Um so das pH-Optimum für die Homospermidin-umsetzende Reaktion zu erhalten, wurden die Wurzelrohextrakte auf 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten (pH-Wert: 5, 6, 7, 8 und 9) umgepuffert und anschließend mit Homospermidin als Substrat inkubiert (siehe Tabelle 18).

R _f -Wert pH-Wert	Hspd 0,30	Produkt 5 0,22 Peak 5	Produkt 2 0,40 Peak 2	Produkt 3 0,53 Peak 3	Produkt 4 0,83	Putrescin- Standard 0,70
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	+	-
8	+/-	+	+	+	+	-
9	+	-	+	-	+	-

Tabelle 18: Inkubationen von *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat bei verschiedenen pH-Werten mit 0,1 U/μl ADH, 0,3 U/μl Catalase und 1 mM NADH in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (2 mM DTT) bei 30°C für 20 Stunden. Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC-Platte aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte mit dem RITA-System. Die Hauptprodukte sind fettgedruckt dargestellt. +: Peak bei dem pH-Wert vorhanden, -: kein Peak vorhanden. Eine Inkubation bei 37°C zeigten das gleiche Verhalten wie die Inkubation bei 30°C. Die zugehörigen Chromatogramme sind mit dem in Abbildung 22 (2a) dargestellten Chromatogramm vergleichbar (Produkt 2 (Peak 2), Produkt 3 (Peak 3) und Produkt 5 (Peak 5)).

In pH-Werten < 7 konnte kein Umsatz gemessen werden, dagegen war bei pH-Werten > 7 ein Umsatz nachweisbar. Dieses Verhalten entspricht den Eigenschaften von CAOs, da nur positiv geladene Polyamine den Tunnel zum aktiven Zentrum des Enzyms passieren können (siehe Diskussion - 4.5). Auffällig war, dass bei einem pH-Wert von 8 zwei neue Produktpeaks gegenüber einer Inkubation bei pH-Wert 7 entstanden waren. Eine Erklärung könnte in unterschiedlichen Strukturen des oxidierten Homospermidins bei den verschiedenen pH-Werten liegen (siehe Abbildung 21). Dieses Verhalten wurde von Houen et al. [2005] beschrieben.

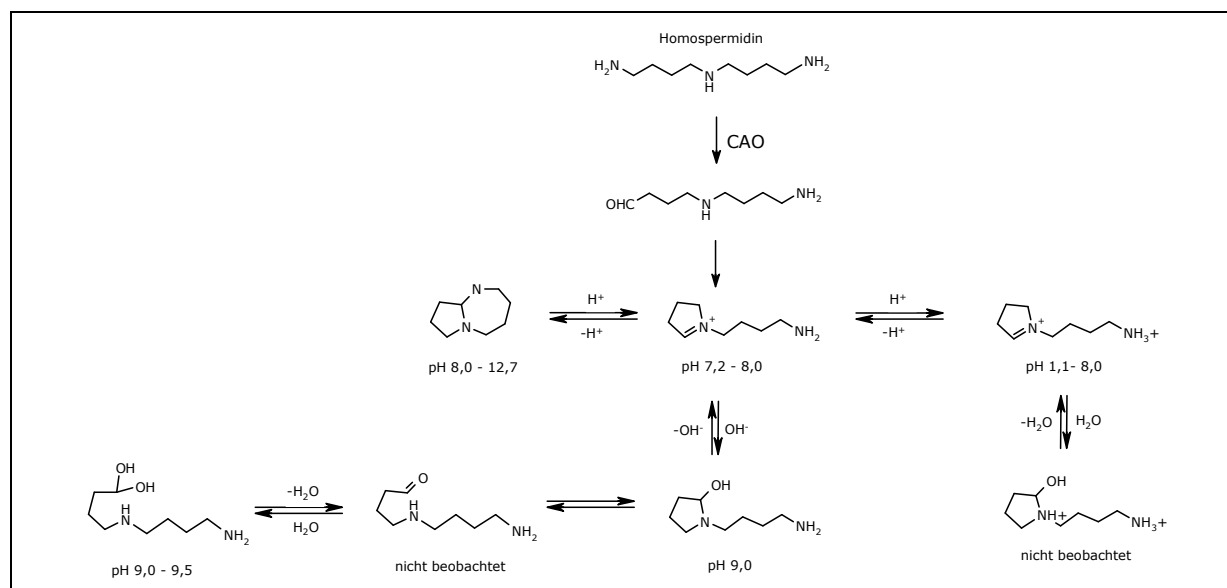


Abbildung 21: Strukturen des oxidierten Homospermidins bei verschiedenen pH-Werten nach Houen et al. [2005].

Das pH-Wert-Optimum der HSS von *S. vernalis* liegt gemäß Ober [1997] in einem Kaliumphosphatpuffer um den pH-Wert von 9. Deshalb wurde der Umsatz eines Wurzelrohextraktes von *S. vernalis* bei den pH-Werten 7, 8 und 9 untersucht. Der pH-Wert in diesem Bereich zeigte keinen Einfluss auf die entstehenden Produkte bei *Senecio vernalis*-Wurzelrohextrakten, nur auf deren Verhältnis zueinander. Es sind teilweise andere Produkte als bei *E. cannabinum*-Inkubationen entstanden. Da in einem Wurzelrohextrakt eine Vielzahl von Enzymen enthalten sind, müssen diese gemessenen Produkte nicht durch ein Enzym der PA-Biosynthese entstanden sein.

	Hspd R _f -Wert	Produkt 1 R _f -Wert	Produkt 2 R _f -Wert	Produkt 3 R _f -Wert	Produkt 4 R _f -Wert	Putrescin- Standard R _f -Wert
Inkubationszeit		Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	
4 h oder 20 h	0,30	0,37	0,40	0,54	0,83	0,70

Tabelle 19: Inkubationen mit *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten mit [¹⁴C]Hspd sowie mit 0,1 U/μl ADH, 0,3 U/μl Catalase und 1 mM NADH in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (2 mM DTT). 10 μl Reaktionsansatz wurden auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte durch das RITA-System. Dargestellt sind die R_f-Werte der entstehenden Produkte und die Hauptprodukte sind fettgedruckt. Die Inkubationszeit (Probenahme nach 4 h und 20 h) und auch der pH-Wert (7, 8 und 9) hatten keinen Einfluss auf die entstehenden Produkte. Die zugehörigen Chromatogramme waren mit dem in Abbildung 18 (1a) dargestellten Chromatogramm vergleichbar (Produkt 1 (Peak 1), Produkt 2 (Peak 2), Produkt 3 (Peak 3) und Produkt 4 (Peak 4)). Die beiden Produkte 1 und 2 waren durch das Polyamin-FM nicht vollständig zu trennen.

Auch der Einfluss der Zusätze (Catalase, ADH und NADH) auf die entstehenden Produkte wurde untersucht. Einige Inkubationen mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat erfolgten nur mit Catalase, mit Catalase und ADH, mit Catalase und NAD⁺, mit Catalase und NADH oder mit Catalase und ADH, NAD⁺ bzw. NADH (siehe Tabelle 20 und Tabelle 21). Um zu bestätigen, dass der Umsatz durch eine CAO bzw. PAO entstanden ist, wurde 1 mM HEH einer Inkubation zugesetzt. Es war bei HEH-Zusatz kein Umsatz zu messen.

<i>E. cannabinum</i> -Wurzelrohextrakte	Hspd Edukt R _f -Wert 0,30	Produkt 5 R _f -Wert 0,22 Peak 5	Produkt 2 R _f -Wert 0,40 Peak 2
Catalase	+	-	-/+
ADH + Catalase	+	-	-/+
NADH + Catalase	-	-	+
NAD ⁺ + Catalase	-	-	+
NADH + Catalase nach 1, 2 bzw. 4 h Inkubation → + ADH	-	+	+
ADH + NADH + Catalase	-	+	+
ADH + NAD ⁺ + Catalase	-	+	+
ADH + NAD ⁺ + Catalase (Konzentrationen: 1/10)	-	+	+
ADH + NADH + Catalase + 1 mM HEH	+	-	-

Tabelle 20: Einfluss von verschiedenen Zusätzen auf Inkubationen von *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten mit [¹⁴C]Hspd bei 30°C für 20 h mit 0,1 U/μl ADH, 0,3 U/μl Catalase und 1 mM NADH/NAD⁺ in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7 mit 2 mM DTT). Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC aufgetragen. Die Trennung erfolgte im Polyamin-Fließmittel und die Detektion mit dem RITA-System. +: Peak, -: kein Peak. Die gemessenen Chromatogramme sind dem in Abbildung 18 (2a) dargestellten Chromatogramm vergleichbar (Produkt 2 (Peak 2) und Produkt 5 (Peak 5)).

Wenn der *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakt nur mit Catalase oder mit Catalase und ADH inkubiert wurde, fand kaum ein Abbau von Homospermidin statt, d. h. in sehr geringer Menge war das Produkt 2 entstanden (siehe Tabelle 20). Anders sah es aus, wenn NADH oder NAD⁺ in einer Konzentration von 1 mM im Ansatz vorhanden war. Hier war das Produkt 2 entstanden. Wenn neben 1 mM NADH/NAD⁺ auch ADH im Inkubationsansatz enthalten war, entstand zusätzlich zum Produkt 2 das Produkt 5. Das gleiche Verhalten war bei einer Inkubation mit Catalase und NADH und bei späterer ADH-Zugabe sowie der Verringerung der Catalase und ADH im Ansatz auf 1/10 der sonst eingesetzten Konzentrationen zu messen. Das Produkt 5 könnte durch eine Reaktion mit der ADH aus dem Produkt 2 entstanden sein.

	Hspd R_f-Wert 0,30	Produkt 5 R_f-Wert 0,22	Produkt 1 R_f-Wert 0,37 Peak 1	Produkt 2 R_f-Wert 0,40 Peak 2
<i>S. vernalis</i>-Wurzelrohextrakte				
Catalase	-	+	-	+
ADH + Catalase	-	+	-	+
NADH + Catalase	-	-	+	+
NAD ⁺ + Catalase	-	-	+	+
ADH + NADH + Catalase	-	-	+	+
ADH + NAD ⁺ + Catalase	-	-	+	+
NADH + Catalase nach 1, 2 bzw. 4 h Inkubation → + ADH	-	-	+	+
ADH + NADH + Catalase + 1 mM HEH	+	-	-	-

Tabelle 21: Einfluss von verschiedenen Zusätzen auf Inkubationen von *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten mit [¹⁴C]Hspd bei 30°C für 20 h mit 0,1 U/μl ADH, 0,3 U/μl Catalase und 1 mM NADH/NAD⁺ in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7 mit 2 mM DTT). Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC aufgetragen. Die Trennung erfolgte im Polyamin-Fließmittel und die Detektion mit dem RITA-System. +: Peak, -: kein Peak. Die erhaltenen Chromatogramme waren dem in Abbildung 18 (1a) dargestellten Chromatogramm vergleichbar (Produkt 1 (Peak 1) und Produkt 2 (Peak 2)).

Bei Inkubationen von *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten ohne NADH/NAD⁺-Zusatz entstand neben dem Produkt 2 das Produkt 5 (siehe Tabelle 21). Wenn dieser Ansatz nach einer, zwei oder auch erst nach vier Stunden mit ADH und NADH versetzt wurde, entstanden die oben genannten Produkte aus Tabelle 19. Produkt 1 ist durch den Zusatz von NADH/NAD⁺ entstanden.

3.2.2.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktinkubationen mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat

Es fiel auf, dass die Inkubationen der Wurzelrohextrakte der beiden PA-Pflanzen *S. vernalis* und *E. cannabinum* ein etwas unterschiedliches Peakspektrum ergaben (siehe Tabelle 22). Es entstand bei beiden eine Substanz, die einen R_f-Wert von 0,40 im Polyamin-FM besaß.

Die Umsätze bei *S. vernalis* und *E. cannabinum* sind durch eine CAO bzw. PAO entstanden, da durch 1 mM HEH im Inkubationsansatz kein Umsatz mehr zu messen war. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Umsätze durch die Zusätze oder eine chemische Reaktionen entstanden waren, da auch

erhitzte Extrakte und Ansätze versetzt nur mit [^{12}C]Homospermidin keinen Umsatz zeigten. Im Gegensatz zu *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten hatte der pH-Wert > 7 einen Einfluss auf die Produkte von *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktinkubationen. Bei beiden hatten die Zusätze ADH bzw. NADH/NAD $^{+}$ einen Einfluss auf die Reaktion (siehe 3.2.2.1). Eine CAO besitzt laut Literatur keine NAD $^{+}$ /NADH-Abhängigkeit. Diese neuen Produkte könnten aus den CAO-Produkten bzw. PAO-Produkten entstanden sein, da in einem Wurzelrohextrakt eine Vielzahl von Enzymen vorhanden ist. Das pH-Wert-Optimum des Umsatzes liegt im Bereich von 7-8. Die entstandenen Produkte konnten durch Dünnschichtchromatographie nicht identifiziert werden. Es konnte nur ausgeschlossen werden, dass Putrescin entstanden war (siehe Tabelle 543). Damit konnte eine Oxidation des Homospermidins an der sekundären Aminogruppe ausgeschlossen werden.

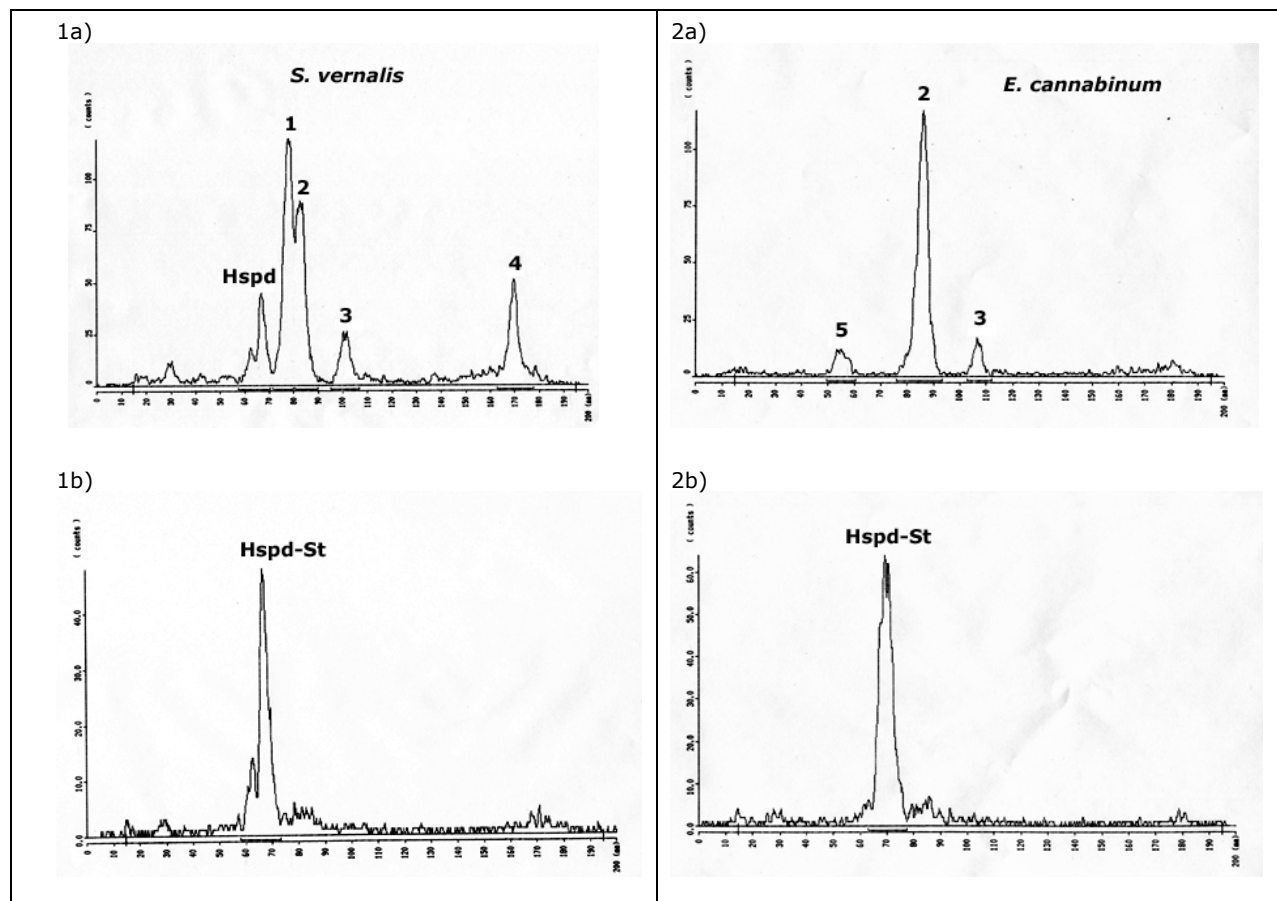


Abbildung 22: Dünnschichtchromatogramme von Inkubationen mit Wurzelrohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit [^{14}C]Hspd. Die Inkubation erfolgte mit 0,3 U/ μl Catalase, 0,1 U/ μl ADH und 1 mM NADH in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (2 mM DTT) bei 30°C für 4 Stunden. 10 μl Probe wurden aus einem 70 μl Ansatz auf eine DC aufgetragen, mit dem Polyamin-FM aufgetrennt und anschließend mit dem RITA-System gemessen. Die zugehörigen R_f -Wert der Peaks sind in Tabelle 22 dargestellt.

1a) *S. vernalis*-Wurzelrohextrakt-Inkubation (pH-Wert: 7), Peaks 1 und 2 sind die Hauptpeaks

1b) *S. vernalis*-Wurzelrohextrakt-Inkubation zugehöriger Hspd-Standard

2a) *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakt-Inkubation (pH-Wert: 8), Peak 2 ist der Hauptpeak

2b) *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakt-Inkubation zugehöriger Hspd-Standard

	Produkt 5	Produkt 1	Produkt 2	Produkt 3	Produkt 4
R_F-Wert	0,22	0,37	0,40	0,54	0,83
Peak	5	1	2	3	4
<i>S. vernalis</i>	nur ohne NADH/NAD ⁺ - Zusatz	+++	+++	+	+
<i>E. cannabinum</i>	nur mit NADH/NAD ⁺ + ADH-Zusatz	-	+++	nur pH-Wert 8	+
Identifikation nach Tabelle 53	Verbindung „X“?	?	?	Retronecin? Supinidin?	?

Tabelle 22: Zusammenfassung - Vergleich der entstandenen Produkt-Peaks (R_F-Werte) von Inkubationen mit Wurzelrohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit [¹⁴C]Hspd in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (2 mM DTT, pH-Wert von 7 und 8) bei 30°C mit 0,3 U/μl Catalase, 0,1 U/μl ADH und 1 mM NADH. Nach Polyamin-FM-Auftrennung erfolgte die Detektion mit dem RITA-System. Eine mögliche Identifikation der Peaks wurde nach Tabelle 53 durchgeführt (siehe 3.8.2.1). Die Inkubationszeit von vier oder 20 Stunden hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der entstehenden Produkte. +++: prozentualer Hauptanteil, +: prozentualer Nebenanteil, -: kein Peak gemessen.

3.2.3. Identifizierung von Produkten

Die entstehenden Substanzen der Rohextraktinkubationen von *P. sativum*, *S. vernalis* und *E. cannabinum* (siehe 3.2.1 und 3.2.2) konnten an Hand der R_F-Werte von Standards (siehe Tabelle 53) über Dünnschichtchromatographie nicht ausreichend identifiziert werden. Deshalb wurde eine Identifizierung mit Sprühreagenzien, mit der HPLC und GC-MS-Messung durchgeführt.

3.2.3.1. Sprühreagenzien

Zur weiteren Charakterisierung der entstanden Produkte aus Inkubationen von *E. cannabinum*- und *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten mit Homospermidin als Substrat wurden Sprühreagenzien verwendet (siehe 2.16.1.2). Dafür wurde 1 ml umgepufferter Rohextrakt mit 6,6 μg [¹²C]Homospermidin versetzt, mit Catalase, Alkoholoxidase und NADH bei 30°C für 20 Stunden inkubiert (siehe 2.15.6 und 3.8.2.3) und anschließend jeweils die Hälfte des Ansatzes auf je eine von zwei Kieselgelplatten aufgetragen und im Polyamin-Fließmittel aufgetrennt. Zur Kontrolle des Umsatzes wurde 70 μl Wurzelrohextrakt, in dem nur [¹⁴C]Homospermidin neben Catalase, ADH und NADH enthalten war, inkubiert und mit der Radio-Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe 2.16.1). In diesem Kontrollansatz wurde Homospermidin zu den bereits in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Produkten umgesetzt. Nach Trocknung der Kieselgelplatten wurden diese mit dem Ninhydrin-Sprühreagenz zum Nachweis von Aminogruppen und mit dem Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagenz zum Nachweis von Aldehyd- und Ketogruppen besprüht. Keine Substanz konnte mit diesen Sprühreagenzien nachgewiesen werden. Die mit aufgetragenen Standards (Putrescin, Homospermidin, Arginin und Ornithin für Aminogruppen sowie Benzaldehyd für Aldehydgruppen) zeigten eine positive Reaktion. Ein Problem könnte die Nachweisgrenze sein. Die Nachweisgrenze der Ninhydrinreaktion liegt bei ca. 1 μg pro Substanz. Andererseits könnten auch Verbindungen entstanden sein, die keine Amino- bzw. Aldehydgruppen besitzen.

3.2.3.2. HPLC

Einige Inkubationsansätze von *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten sowie *P. sativum*-Rohextrakten wurden nach Benzoylierung mit der HPLC analysiert (siehe 2.15.6 und 2.16.2).

Substanz	R _T -Werte [230 nm]/ R _T -Werte [¹⁴ C]	
Putrescin	5,6 min	nach Frölich [1996]
Homospermidin	10,8 min	
Verbindung „X“	3,3 min	
Cadaverin	6,6 min	

Tabelle 23: Retentionszeiten (R_T-Werte) von benzoylierten Polyaminstandards bei der HPLC-Bestimmung. Verwendet wurde RP18-Säulenmaterial, das Fließmittel war aus 40% Acetonitril, 60% 1,5% Phosphorsäure ((v/v), isokratisch) zusammengesetzt und die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 230 nm bzw. durch einen Radio-Detektor (siehe 2.16.2) und das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

In den Reaktionsansätzen von *E. cannabinum*, *S. vernalis* und *P. sativum* konnten nach Derivatisierung mit Benzoylchlorid keine Substanzen der bei UV-Detektion (230 nm) oder durch Radio-Detektion nachgewiesen werden. Die Endprodukte enthielten somit keine mit Benzoylchlorid derivatisierbaren Gruppen oder lagen unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode.

3.2.4. GC-MS-Identifizierung von potentiellen Produkten der Rohextraktinkubationen

Da die Dünnschichtchromatographie und auch die HPLC-Untersuchung der Inkubationsproben von *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten sowie von *Pisum sativum*-Rohextrakten keine näheren Informationen zur Identifizierung der entstandenen Substanzen geliefert hatten (siehe 3.2 und 3.2.3.2), sollten einige Proben mit Hilfe der GC-MS-Messung untersucht werden, um so Strukturen von Verbindungen zu identifizieren. Auf diese Art können Informationen über einen Reaktionsmechanismus und die beteiligten Enzyme gewonnen werden.

Es wurde jeweils 1 ml Wurzelrohextrakt von *S. vernalis* und *E. cannabinum* sowie Rohextrakt von *P. sativum* mit [¹²C]Homospermidin, Catalase, NADH und ADH inkubiert. Vor der Inkubation wurde zur Kontrolle eines Umsatzes ein 40-70 µl großes Aliquot abgenommen und mit radioaktivem [¹⁴C]Homospermidin versetzt. Diese Kontrolle wurde parallel zum [¹²C]Homospermidin-Ansatz bei 30°C für 4 bzw. 20 h inkubiert (siehe 3.8.2.3 - Etablierung eines Radio-Assays für CAO). Der Kontrollansatz wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Umsatz analysiert (siehe 2.16.1.2).

Die Nachweisgrenze einer Substanz bei einer GC-MS-Messung liegt bei ca. 100 ng. Es wurden Proben mit einer [¹²C]Homospermidin-Konzentration von 5, 25 und 50 ng/µl inkubiert. Bei der „5 ng/µl“-Probe war Homospermidin in die beschriebenen Produkte (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) vollständig umgesetzt worden.

Zur Messung von Proben mit GC-MS war es nötig, durch Derivatisierung leichtflüchtige Verbindungen herzustellen. Deshalb wurden nach der Inkubation die Ansätze mit den Produkten eingeeengt und mit Methylchloroformiat (MCF) sowie *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

(MSTFA) derivatisiert (siehe 2.16.3). Da keine Informationen über die entstandenen Produkte vorlagen, musste erst einmal eine Derivatisierungsmethode gefunden werden, mit der die entstandenen Produkte derivatisierbar waren. Zur Überprüfung der Derivatisierungsmethode wurden [^{14}C]markierte Inkubationsansätze (Kontrollansätze siehe oben) nach Derivatisierung mit Ethylacetat extrahiert und mit Hilfe der Szintillationsmessung (siehe 2.16.4) der Anteil an extrahierbarer Radioaktivität bestimmt (siehe Tabelle 24).

Derivatisierungs-Methode	Extraktionsmittel	Homospermidin-Blindwert	Inkubationsproben
MCF (2.16.3.1)	Ethylacetat	60%	5-10%
MSTFA (2.16.3.2 a))	Ethylacetat	40%	40%
MSTFA (2.16.3.2 b))	Ethylacetat	14%	2%
MSTFA (2.16.3.2 c))	Ethylacetat	90%	50%

Tabelle 24: Anteil an extrahierbarer Aktivität in Prozent - Effizienz der Derivatisierung von vier verschiedenen Methoden (siehe 2.16.3) von Produkten aus Inkubationsansätzen von *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten mit [^{14}C]Homospermidin bei 30°C in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (2 mM DTT) für 20 h mit 0,3 U/μl Catalase, 0,1 U/μl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH. Als Blindwert wurde für 5 min bei 95°C erhitzter Rohextrakt mit [^{14}C]Homospermidin versetzt und gleichbehandelt. Die Bestimmung erfolgte durch Szintillationsmessung (siehe 2.16.4).

Die MSTFA-Methode c stellte sich als am effektivsten heraus. Diese Werte enthielten aber keine Informationen darüber, wie groß der Anteil der extrahierbarer Aktivität von den Produkten ist. Deshalb wurden die mit MCF und die mit MSTFA derivatisierten Proben mit GC-MS untersucht. Bei der GC-MS-Messung zeigte sich, dass die derivatisierten Proben zu viele Störsubstanzen und zu viel nicht umgesetztes Homospermidin enthielten, so dass keine Produkte identifiziert werden konnten.

Zur Abtrennung von Pflanzeninhaltsstoffen und anderen Störsubstanzen (z. B. Catalase, ADH und NADH) wurde daher eine Reinigung durch die Dünnschichtchromatographie getestet (siehe 2.16.3.3). Dazu wurde der gesamte [^{12}C]Homospermidin-Inkubationsansatz auf eine DC aufgetragen und die Produkte im Polyamin-Fließmittel aufgetrennt. Parallel wurde ein radioaktivmarkierter Kontrollansatz (s. o.) mit aufgetrennt und mit dem RITA-System untersucht (siehe 2.16.1.2). Die Laufhöhe der radioaktiven Substanzen wurde markiert, um so die [^{12}C]Produkte aus den daneben liegenden Spuren der Kieselgelplatte kratzen zu können. Bei der GC-MS-Messung war nach Derivatisierung keine Substanz nachweisbar. Durch diese Art der Produktreinigung wurde möglicherweise die Nachweisgrenze der GC-MS unterschritten oder die Produkte wurden nicht durch Wasser vom Kieselgel eluiert. Es sollte als Elutionsmittel das Fließmittel getestet werden.

3.2.5. FPLC – Anreinigung von Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus *E. cannabinum*- und *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten

Eine Identifizierung von Produkten aus Inkubationen von Wurzelrohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* durch die GC-MS-Messung war nicht erfolgreich. Es waren zu viele Störsubstanzen in den Wurzelrohextrakten vorhanden (siehe 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.4). Deshalb sollten die Homospermidin-umsetzende Enzyme aus den Wurzelrohextrakten durch die FPLC angereinigt werden. Von verschiedenen CAOs aus Pflanzen (*Pisum sativum*, *Euphorbia characias*, *Vicia faba*, *Trifolium subterraneum*, *Lens culinaris* u. a.) sind Reinigungsverfahren in der Literatur beschrieben worden [Matsuda und Suzuki, 1981; Federico et al., 1985; Delhaize und Webb, 1987; Padigla et al., 1991; McGuirl et al., 1994; Padigla et al., 1998]. Dabei wurden die CAOs über verschiedene Säulenmaterialien gereinigt. Häufig erfolgte die Reinigung über mehrere Stufen. Dabei wurden u. a. DEAE und Hydroxylapatit verwendet. Über Vorversuche sollte herausgefunden werden, an welches Säulenmaterial Proteine binden, die Homospermidin als Substrat umsetzen. Dazu wurden Batch-Tests (siehe 2.14.2) mit umgepufferten Wurzelorganrohextrakten (siehe 2.12.7) von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit drei verschiedenen Säulenmaterialien (Hydroxylapatit, Phenylsepharose und DEAE-Fractogel) durchgeführt. Aktivitätstests wurden mit dem Durchlauf, der Waschfraktion, der Elutionsfraktion sowie mit dem umgepufferten Wurzelrohextrakt als Kontrolle mit [¹⁴C]Hspd als Substrat durchgeführt (siehe 2.15.6 und 3.8.2.6). Bei Hydroxylapatit und dem DEAE-Fractogel war eine Bindung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme an das Säulenmaterial erfolgt. Bei Phenylsepharose war keine direkte Aussage möglich, da in der Wurzelrohextraktkontrollprobe kein Umsatz gemessen wurde. Deshalb wurde ein Reinigungsverfahren für die FPLC für alle drei Materialien entwickelt (siehe 2.14.3 Puffer-B-Gradient-1).

3.2.5.1. FPLC-Reinigung durch eine Hydroxylapatit-, DEAE-Fractogel- und einer Phenylsepharose-Säule mit dem Puffer-B-Gradient-1

Bei der FPLC-Anreinigung wurde eine 1-ml-Gelbettvolumen-Säule verwendet und die Proteine wurden in 1-ml-Fractionen von der Säule eluiert. Mit einem Bradford-Schnelltest wurden die Fractionen auf Protein getestet (siehe 2.12.4). Die Protein-Fractionen wurden teilweise vereinigt oder auch einzeln verwendet. Nach Umpufferung (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH-Wert 7, 2 mM DTT) wurde ein Aktivitätstest mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat, 0,3 U/μl Catalase, 0,1 U/μl ADH und 1 mM NADH in einem 35 μl bzw. 70 μl-Ansatz durchgeführt (siehe 2.15.6). Die Inkubation fand für 4 h und 20 h bei 30°C statt. 10 μl von dem Reaktionsansatz wurden auf eine DC aufgetragen, im Polyamin-Fließmittel entwickelt und mit dem RITA-System untersucht (siehe 2.16.1).

Bei der **Phenylsepharose-Säule** war keine Bindung von Homospermidin-umsetzenden Proteinen erfolgt. Die Aktivität wurde in den Waschfractionen der Säule nachgewiesen. Die Bindung erfolgte bei der **Hydroxylapatit-** und dem **DEAE-Fractogel-Säule** (siehe Abbildung 24 bis Abbildung 34). Die Homospermidin-umsetzenden Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min in die Fractionen 5-7 (*S. vernalis*, Puffer-B-Konzentration: 25-35%) und 5-11 (*E. cannabinum*, Puffer-B-Konzentration: 25-55%) von der Hydroxylapatitsäule und in die Fractionen 6-9 (*S. vernalis*, Puffer-B-Konzentration:

30-45%) und 7-10 (*E. cannabinum*, Puffer-B-Konzentration: 35-50%) von der DEAE-Fractogel-Säule mit dem Puffer-B-Gradient-1 eluiert.

S. vernalis-Wurzelrohextrakt:

DEAE-Fractogel-Säule:

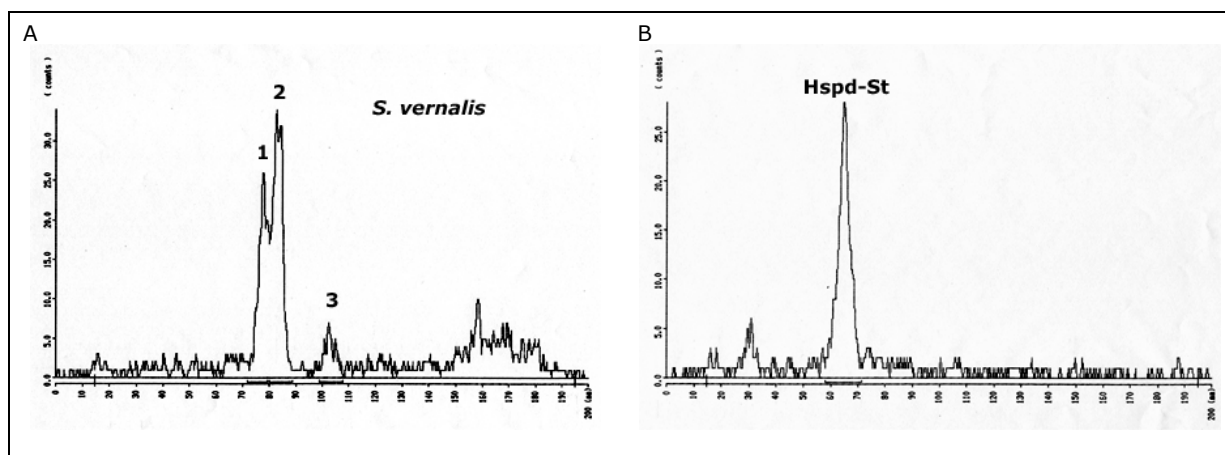


Abbildung 23: Chromatogramm einer Inkubation, der mit einer 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule angereinigten Homospermidin-umsetzenden Enzyme in Fraktion 6 eines *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes mit Puffer-B-Gradient-1 (siehe 2.14.3), Fraktionsgröße: 1 ml. A: Die Inkubation erfolgte in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7, 2 mM DTT) mit [14 C]Hspd, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 20 h bei 30°C in einem 35 μ l Ansatz. 10 μ l Probe wurden auf eine DC-Platte aufgetragen, die Auftrennung erfolgte im Polyamin-FM und die Detektion mit dem RITA-System. Es wurden Peak 1 (Produkt 1, R_F -Wert: 0,37), Peak 2 (Produkt 2, R_F -Wert: 0,40) und Peak 3 (Produkt 3, R_F -Wert: 0,48) gemessen. B: Homospermidin-Standard.

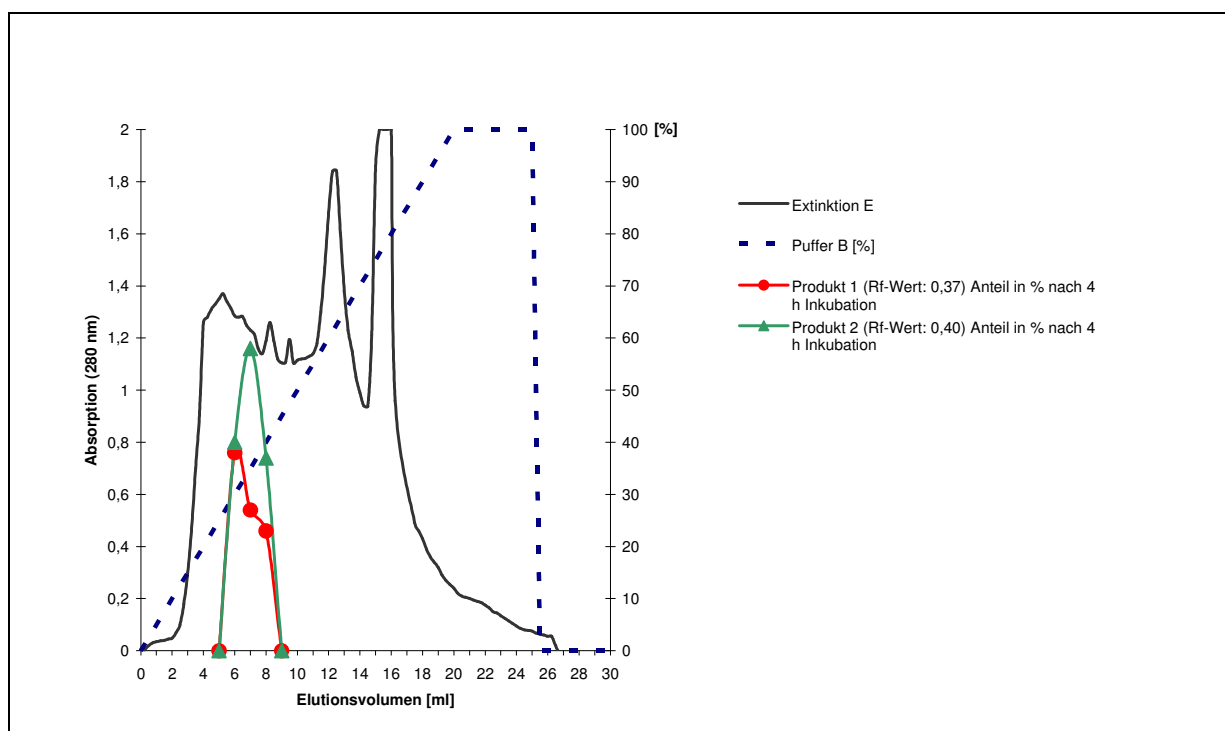


Abbildung 24: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule (2.14.3). Die Darstellung zeigt die gemessene Absorption bei 280 nm und den prozentualen Anteil von zwei entstandenen Produkten mit den R_F -Werten: 0,37 und 0,40 (Polyamin-FM) nach 4 h Inkubation bei 30°C mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH im Inkubationsansatz (siehe 2.15.6).

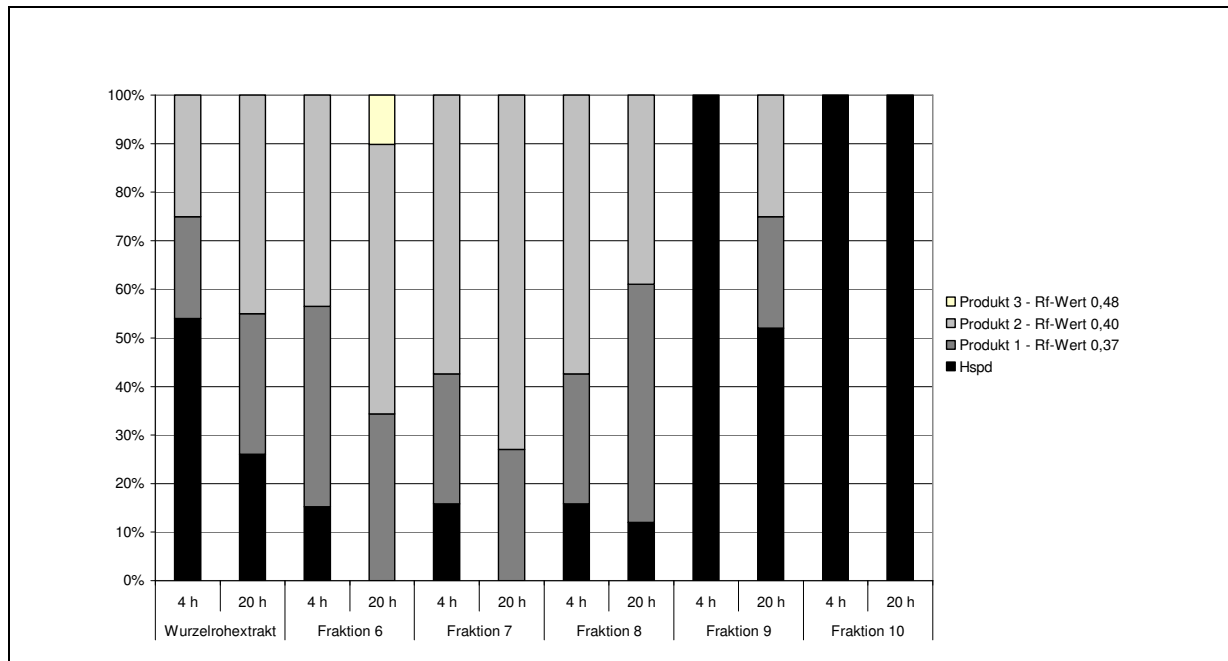


Abbildung 25: Prozentualer Anteil an Homospermidin und drei Produkten (R_f -Wert: 0,37, 0,40 und 0,48 im Polyamin-FM) in den Fraktionen 6-10 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-DEAE-*Fractogel*-Säule (2.14.3). Die Inkubation wurde mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 4 bzw. 20 h bei 30°C durchgeführt (siehe 2.15.6). Von der Probe wurden 10 μ l auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System. Vergleich mit einer Wurzelrohextrakt-Kontrollinkubation, die parallel zu den Fraktionen inkubiert wurde.

Hydroxylapatit-Säule:

Das Chromatogramm einer Inkubation einer Fraktion, der mit einer Hydroxylapatit-Säule angereinigten Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes, war mit Abbildung 23 vergleichbar. Nur war kein Peak 3 vorhanden.

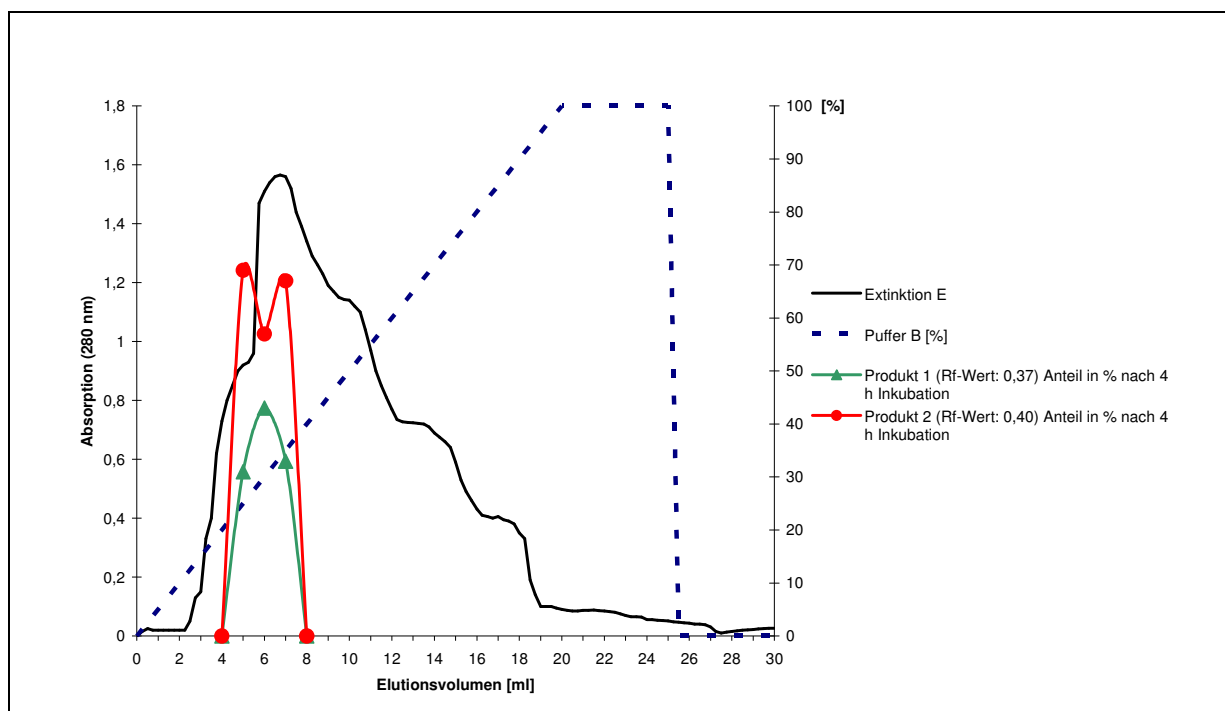


Abbildung 26: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-Hydroxylapatit-Säule (2.14.3). Die Darstellung zeigt die gemessene Absorption bei 280 nm und den prozentualen Anteil von zwei entstandenen Produkten mit den R_F -Werten: 0,37 und 0,40 im Polyamin-FM nach 4 h Inkubation bei 30°C mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH im Inkubationsansatz (siehe 2.15.6).

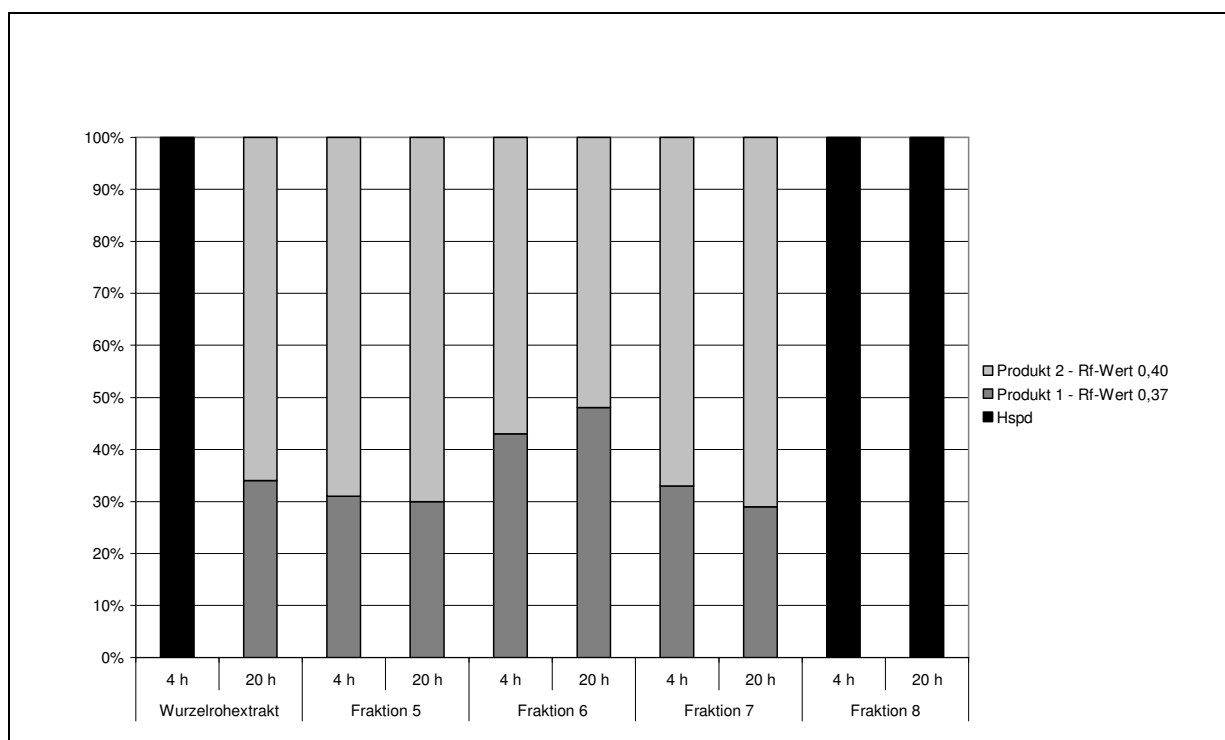


Abbildung 27: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten (R_F -Wert: 0,37 und 0,40 im Polyamin-FM) in den Fraktionen 5-8 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule (2.14.3). Die Inkubation wurde mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 4 bzw. 20 h Inkubation 30°C durchgeführt (siehe 2.15.6). Von der Probe wurden 10 μ l auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System. Vergleich mit einer Wurzelrohextrakt-Kontrollinkubation, die parallel zu den Fraktionen inkubiert wurde.

Es war keine Trennung der Produkt-1- und Produkt-2-bildenden Aktivitäten mit dem Puffer-B-Gradient-1 durch die Hydroxylapatit- oder durch die DEAE-Fractogel-Säule des *S. vernalis*-Wurzelrohextraktes erfolgt (siehe Abbildung 24 bis Abbildung 27).

***E. cannabinum*-Wurzelrohextrakt**

Hydroxylapatit-Säule:

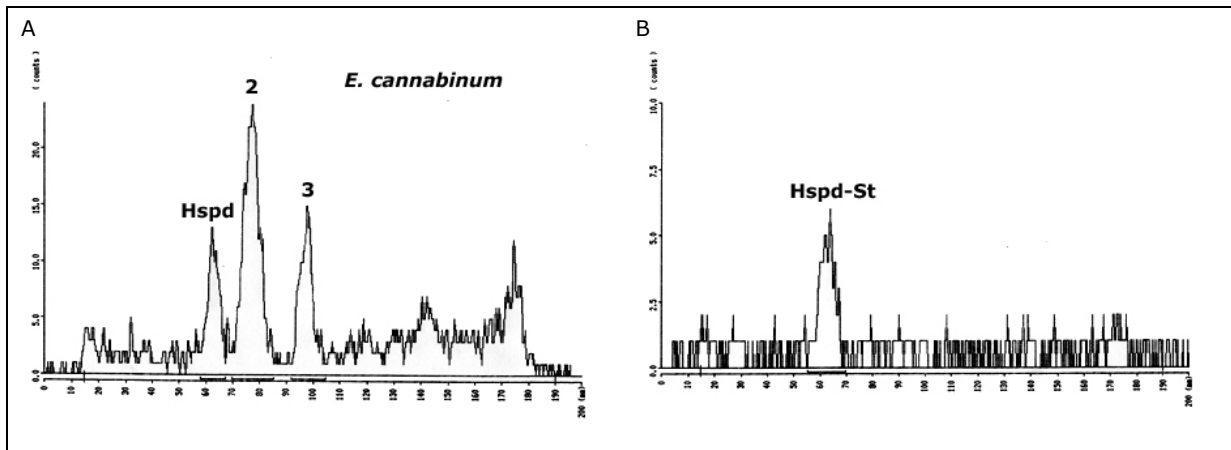


Abbildung 28: Chromatogramm einer Inkubation, der mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule angereicherten Homospermidin-umsetzenden Enzyme aus Fraktion 7 eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit einer mit Puffer-B-Gradient-1 (siehe 2.14.3) (Fraktionsgröße: 1 ml). A: Die Inkubation erfolgte in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7, 2 mM DTT) mit [14 C]Hspd, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 20 h bei 30°C in einem 35 μ l Ansatz. Von der Probe 10 μ l auf DC-Platte aufgetragen, im Polyamin-FM getrennt und mit dem RITA-System detektiert. Es wurden Peak 2 (Produkt 2, R_f -Wert: 0,40) und Peak 3 (Produkt 3, R_f -Wert: 0,53) gemessen. B: Homospermidin-Standard.

Nach 4 Stunden Inkubation mit [14 C]Homospermidin war das Produkt 2 (R_f -Wert: 0,40, Polyamin-Fließmittel) in den Fraktionen 5-13 die Hauptschubstanz. Nach 20 Stunden Inkubation war in den Fraktionen 7-13 eine weitere Substanz (R_f -Wert von 0,53, Polyamin-Fließmittel) nachweisbar. Eine Trennung mit dem Puffer-B-Gradient-1 der Produkt-2- und Produkt-3-bildenden Enzymaktivitäten wurde nur ansatzweise durch die Hydroxylapatit-Säule erreicht (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30).

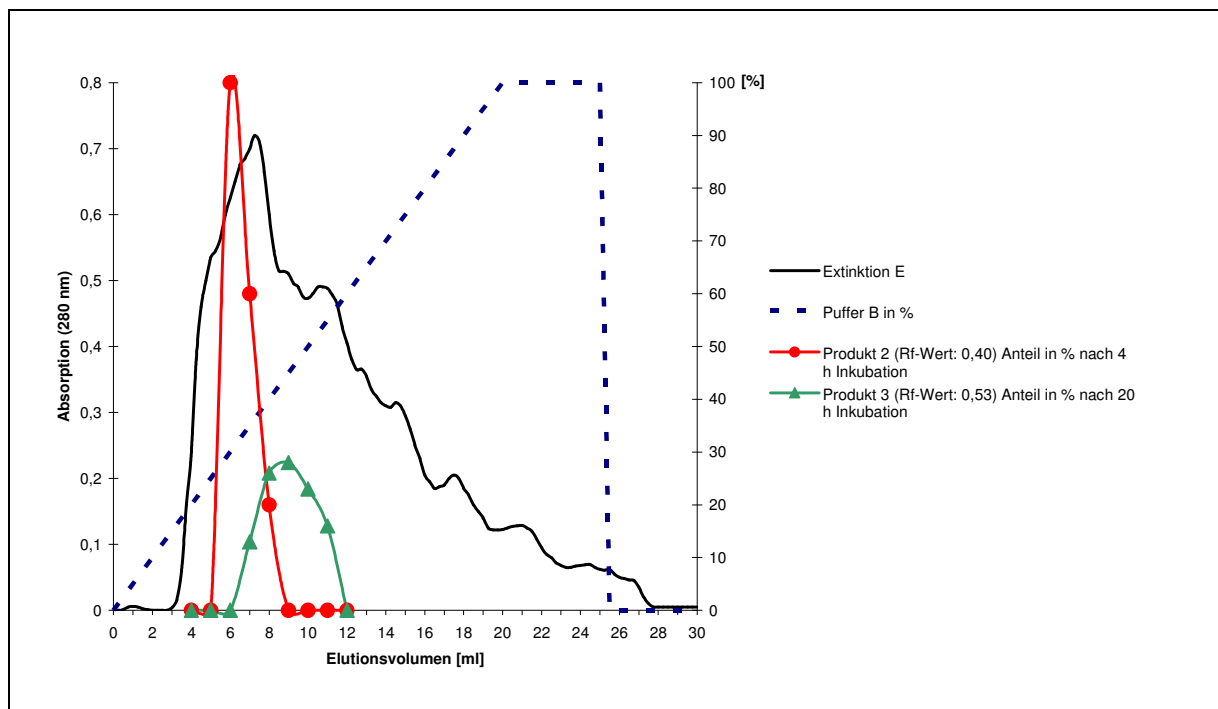


Abbildung 29: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-Hydroxylapatit-Fractogel-Säule (2.14.3). Die Dargestellung zeigt die gemessene Absorption bei 280 nm und den prozentualen Anteil von zwei entstandenen Produkten (R_F -Werten: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) nach 4 bzw. 20 h Inkubation bei 30°C mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH im Inkubationsansatz (siehe 2.15.6).

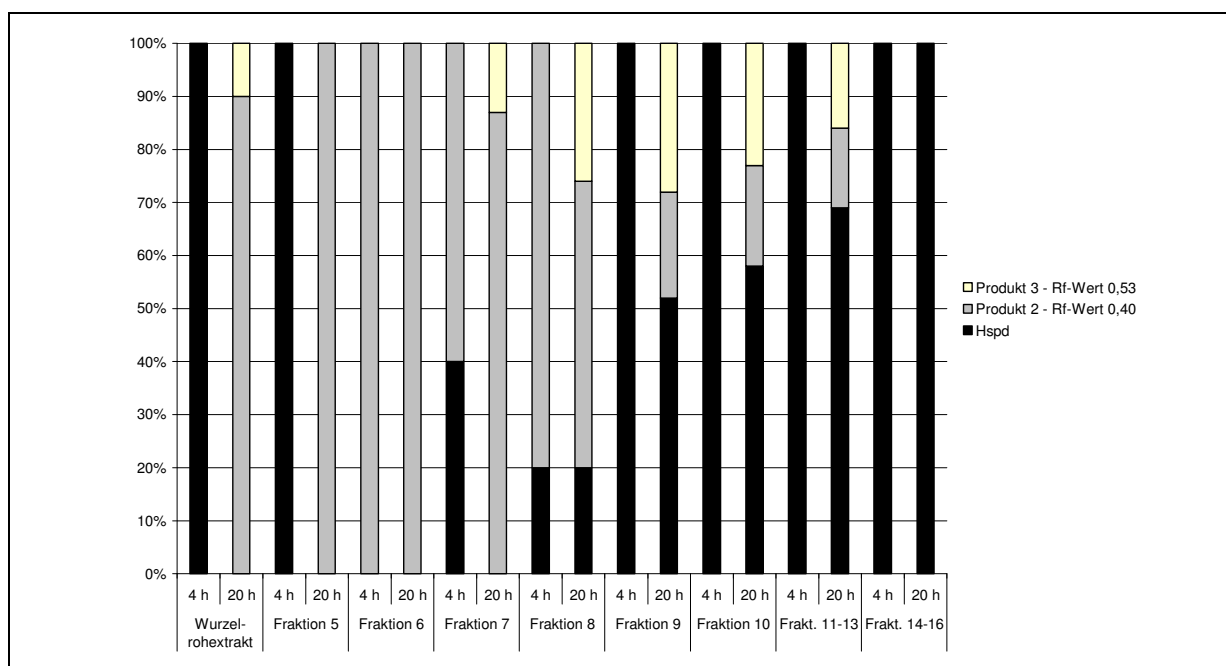


Abbildung 30: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten (R_F -Wert: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) in den Fraktionen 5-16 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule (2.14.3). Die Inkubation wurde mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 4 bzw. 20 h bei 30°C durchgeführt (siehe 2.15.6). Von der Probe wurden 10 μ l auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System. Vergleich mit dem Wurzelrohextrakt als Kontrolle, der parallel zu den Fraktionen inkubiert wurde.

DEAE-Fractogel-Säule:

Das Chromatogramm einer Inkubation mit [14 C]Homospermidin als Substrat einer Fraktion, der mit der DEAE-Fractogel-Säule angereinigten Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes, war mit Abbildung 28 vergleichbar.

Es wurde keine Trennung der Produkt-2- und Produkt-3-bildenden Aktivitäten des *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 durch die DEAE-Fractogel-Säule erreicht (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).

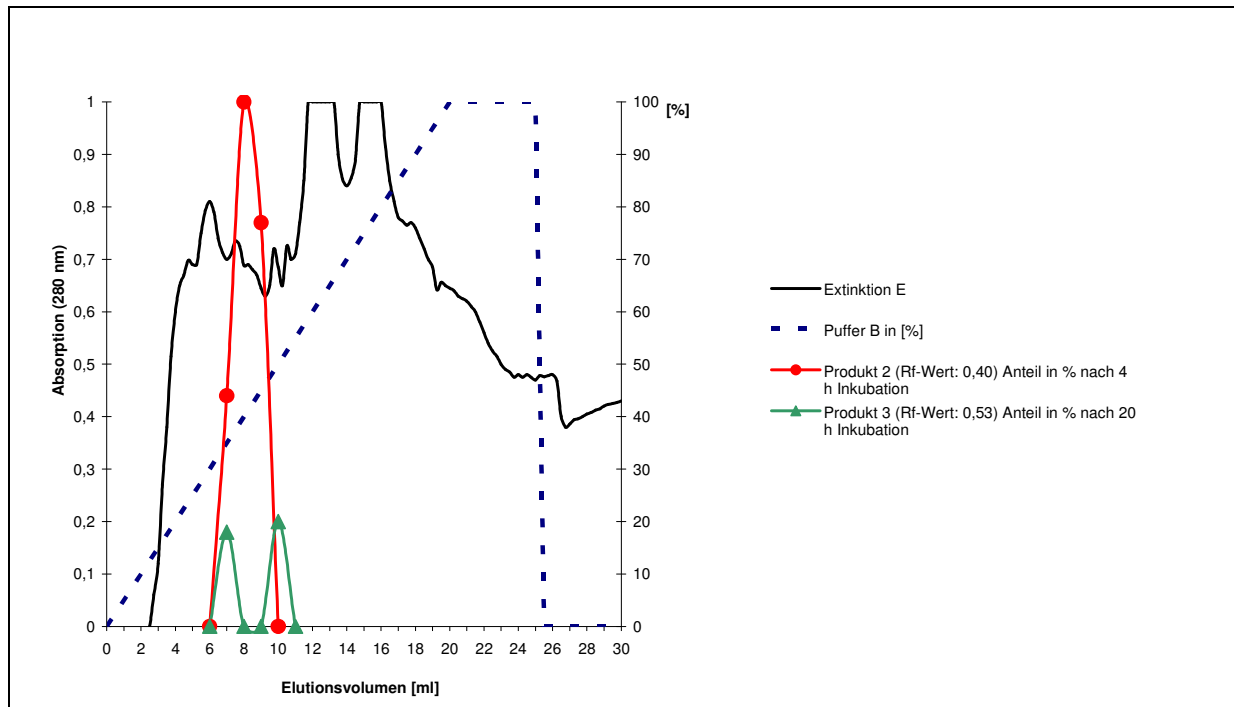


Abbildung 31: FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 über eine 1-ml-DEAE-Fractogel-Säule (2.14.3). Die Darstellung zeigt die gemessene Absorption bei 280 nm und den prozentualen Anteil von zwei entstandenen Produkten (R_f -Werten: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) nach 4 bzw. 20 h Inkubation bei 30°C mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH im Inkubationsansatz (siehe 2.15.6).

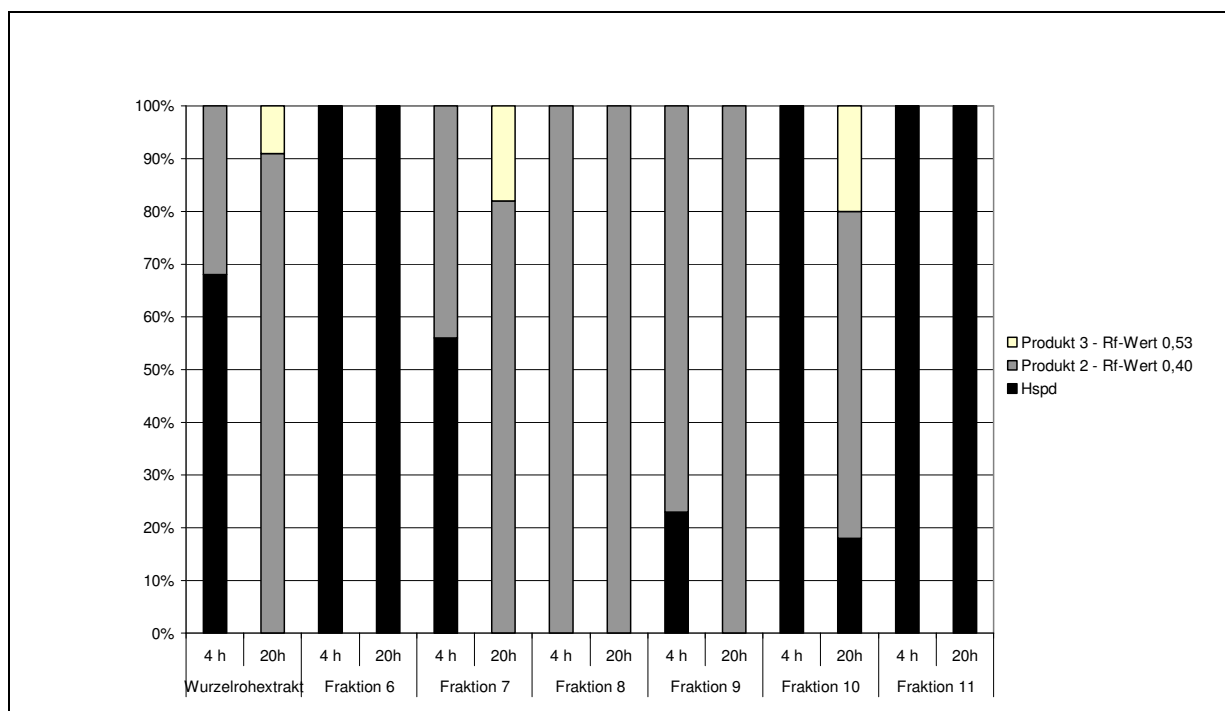


Abbildung 32: Prozentualer Anteil von Homospermidin und zwei Produkten (R_f -Wert: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) in den Fraktionen 6-11 nach FPLC-Reinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-1 mit einer 1-ml-DEAE-Säule (2.14.3). Die Inkubation wurde mit [14 C]Homospermidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 4 bzw. 20 h bei 30°C durchgeführt (siehe 2.15.6). Von der Probe wurden 10 μ l auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System. Vergleich mit dem Wurzelrohextrakt als Kontrolle.

3.2.5.2. FPLC-Reinigung von Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten durch eine Hydroxylapatit- und DEAE- Fractogel-Säule mit dem Puffer-B-Gradient-2

Da die FPLC-Anreinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme eines Wurzelrohextraktes von *E. cannabinum* mit einer Hydroxylapatit-Säule keine vollständige Trennung und bei der DEAE-Fractogel-Säule keine Trennung der beiden Produkt-2- und Produkt-3-bildenden Enzymaktivitäten erreicht wurde (siehe 3.2.5.1), wurde ein neuer Puffer-B-Gradient bei der Hydroxylapatit- und der DEAE-Fractogel-Säule zur Elution der Homospermidin-umsetzenden Proteine getestet (siehe 2.14.3.2).

DEAE-Fractogel-Säule:

Im Gegensatz zum Puffer-B-Gradient-1 wurde bei dem Puffer-B-Gradient-2 bei der DEAE-Fractogel-Säule eine teilweise Trennung der beiden gemessenen Aktivitäten erreicht. Nach 4 Stunden Inkubation war das Produkt 2 (R_f -Wert von 0,4, Polyamin-Fließmittel) in Fraktionen 10-17 die Hauptschubstanz. Nach 20 Stunden Inkubation entstand zusätzlich in den Fraktionen 14-20 (siehe Abbildung 34) das Produkt 3 (R_f -Wert von 0,53, Polyamin-Fließmittel). Dies entspricht einem Puffer-B-Anteil von 20-40% (siehe Abbildung 33).

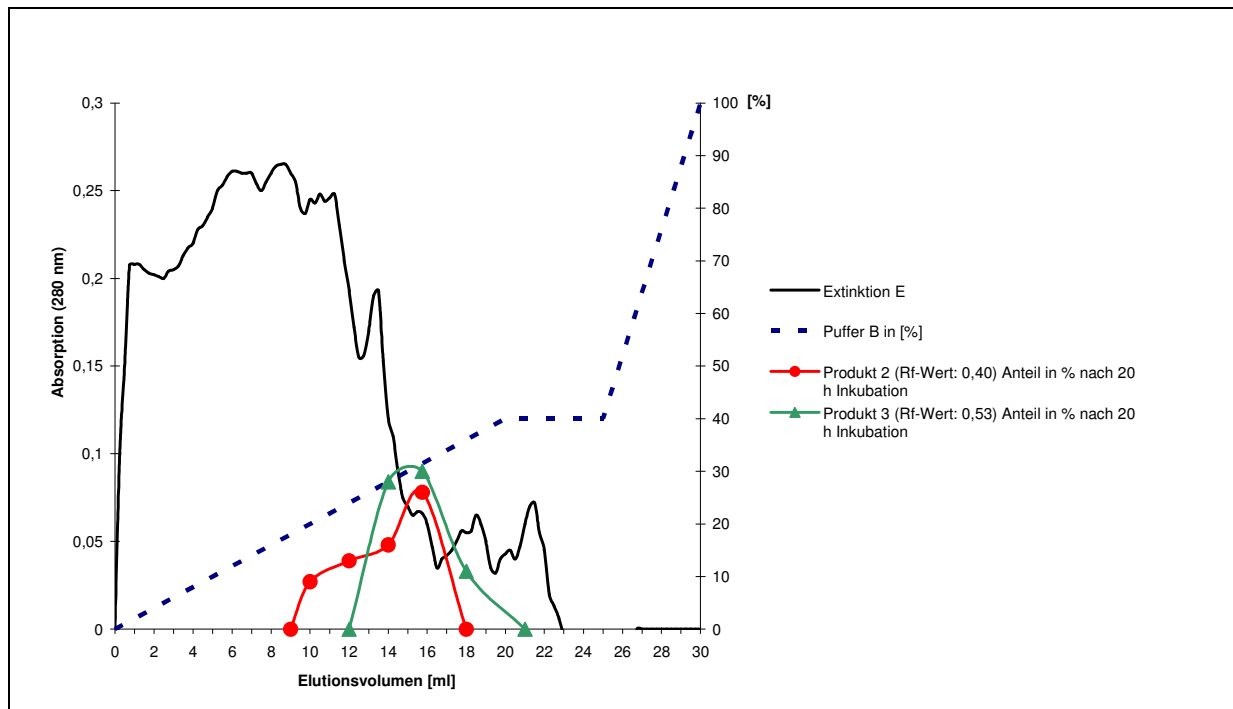


Abbildung 33: FPLC-Reinigung der Homosperridin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 über eine 1-ml-DEAE-*Fractogel*-Säule (2.14.3). Die Darstellung zeigt die gemessene Absorption bei 280 nm und den prozentualen Anteil von zwei entstandenen Produkten (R_f -Werten: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) nach 4 bzw. 20 h Inkubation bei 30°C mit [14 C]Homosperridin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH im Inkubationsansatz (siehe 2.15.6).

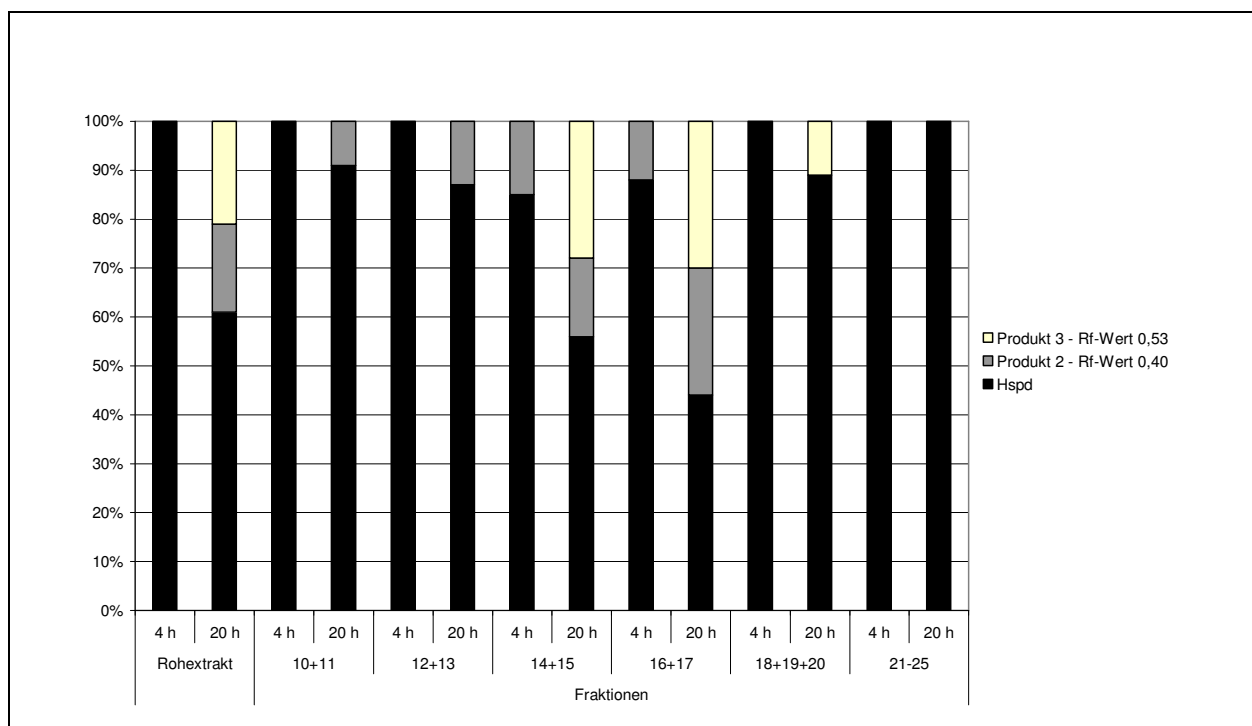


Abbildung 34: Prozentualer Anteil von Homosperridin und zwei Produkten (R_f -Wert: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) in den Fraktionen 10-25 nach FPLC-Reinigung der Homosperridin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 mit einer 1-ml-DEAE-*Fractogel*-Säule (2.14.3). Die Inkubation wurde mit [14 C]Homosperridin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 4 bzw. 20 h bei 30°C durchgeführt (siehe 2.15.6). Von der Probe wurden 10 μ l auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System. Vergleich mit dem Wurzelrohextrakt als Kontrolle, der parallel zu den Fraktionen inkubiert wurde.

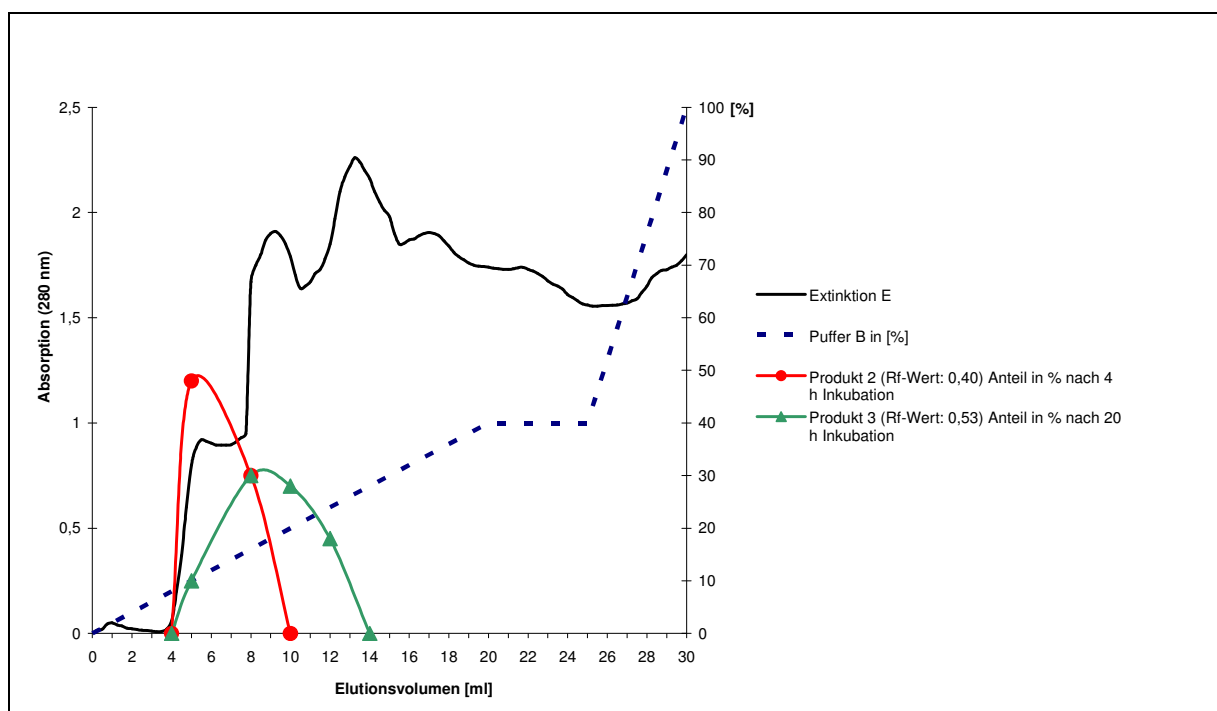
Hydroxylapatit-Säule:

Abbildung 35: FPLC-Reinigung der Homosperrmidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 über eine 1-ml-Hydroxylapatit-Säule (2.14.3). Die Darstellung zeigt die gemessene Absorption bei 280 nm und den prozentualen Anteil von zwei entstandenen Produkten (R_f -Werten: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) nach 4 bzw. 20 h Inkubation bei 30°C mit [14 C]Homosperrmidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH im Inkubationsansatz (siehe 2.15.6).

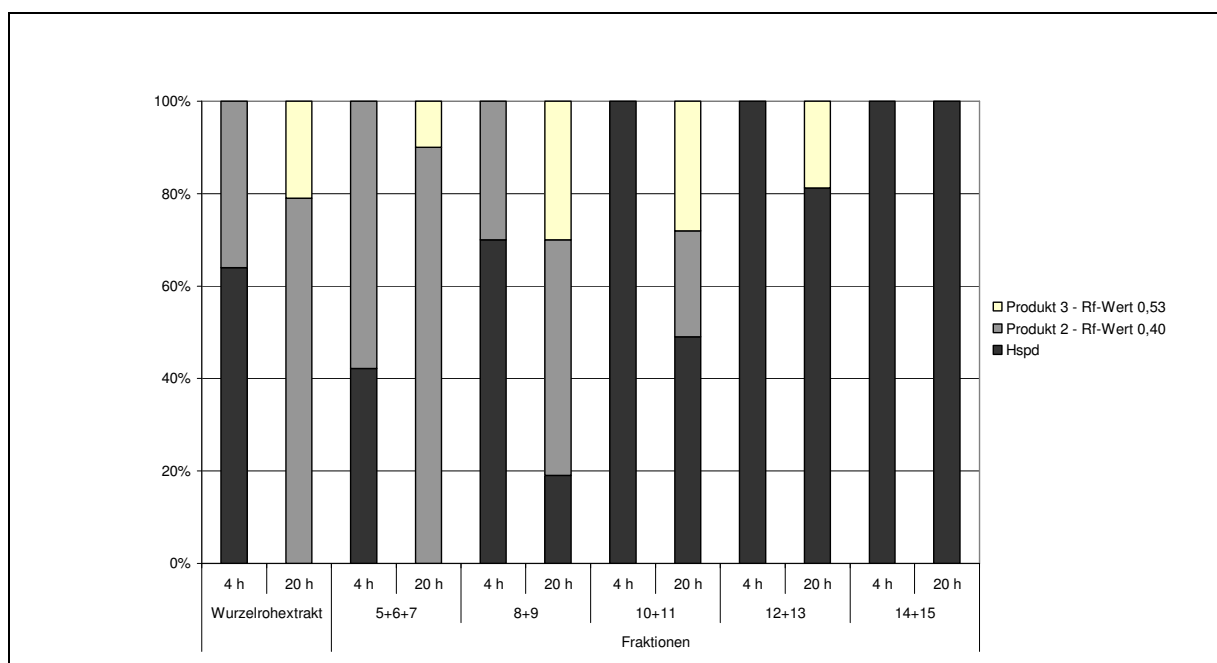


Abbildung 36: Prozentualer Anteil von Homosperrmidin und zwei Produkten (R_f -Wert: 0,40 und 0,53 im Polyamin-FM) in den Fraktionen 5-15 nach FPLC-Reinigung der Homosperrmidin-umsetzenden Enzyme eines *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes mit dem Puffer-B-Gradient-2 mit einer 1-ml-Hydroxylapatit-Säule (2.14.3). Die Inkubation wurde mit [14 C]Homosperrmidin, 1 mM NADH, 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l ADH für 4 bzw. 20 h bei 30°C durchgeführt (siehe 2.15.6). Von der Probe wurden 10 μ l auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-FM entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System. Vergleich mit dem Wurzelrohextrakt als Kontrolle, die parallel mit den Fraktionen inkubiert wurde.

Bei der Hydroxylapatitsäulenaufreinigung mit dem Puffer-B-Gradient-2 befanden sich die Homospermidin-umsetzenden Enzyme in den Fraktionen 5-13 (8-24% Puffer-B-Anteil) (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36). Nach 4 Stunden Inkubation war das Produkt 2 (R_F -Wert: 0,40) das Hauptprodukt, während nach 20 h Produkt 3 (R_F -Wert: 0,53) nachzuweisen war. Eine Trennung der beiden Produkt-2- und Produkt-3-bildenden Enzymaktivitäten wurde mit diesem neuen Puffergradienten an der Hydroxylapatit-Säule nur ansatzweise erreicht.

Weiterhin wurde der pH-Wert-Einfluss auf die Homospermidin-umsetzenden Enzyme untersucht. Dafür wurden die „aktiven“ Fraktionen einer *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakt-Reinigung durch die Hydroxylapatitsäule auf einen pH-Wert von 5, 6, 7, 8 und 9 umgepuffert und mit [14 C]Homospermidin als Substrat inkubiert (siehe 2.15.6.1). Das pH-Wert-Optimum lag bei pH-Wert 7 (0,1 M Kaliumphosphatpuffer). Auch wurde die Hemmung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme durch Zusatz von 0,3 mM HEH überprüft. Bei Zusatz von HEH war kein Umsatz messbar, so dass die Aktivitäten durch eine CAO- bzw. PAO-Aktivität entstanden sein mussten.

3.2.5.3. Nachweis von Chinonproteinen durch Redoxstaining

Zum Nachweis von Chinonproteinen (siehe 1.5) wurde ein Redoxstaining nach einigen FPLC-Aufreinigungen durchgeführt. Einige Fraktionen der DEAE-Fractogel- und Hydroxylapatit-Säulen-Reinigung (siehe 3.2.5.1), die positiv durch ein Radio-Assay auf Aktivität getestet worden waren (siehe 3.2.5), wurden nach Proteinfällung (siehe 2.12.6) auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (siehe 2.12.14.2) und anschließend erfolgte eine Redox-Färbung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NTB) (siehe 2.12.15). Im Vergleich wurden ein unaufgereinigter Wurzelrohextrakt und ein Rinderplasma-Aminoxidase-Standard (BPAO) mit aufgetragen, um so zwei Positivkontrollen zu haben. Bei *E. cannabinum* zeigten die Fraktionen 7-9 der DEAE-Fractogel- (siehe Abbildung 32) und die Fraktionen 5+6 der Hydroxylapatit-FPLC-Aufreinigung (siehe Abbildung 30) sowie die BSAO-Kontrolle eine Schwarz-Blau-Färbung auf Chinonproteine nach dem Blotten. Bei *S. vernalis* war in die Fraktionen 6-8 einer DEAE-Fractogel-FPLC-Aufreinigung (siehe Abbildung 25) ein Chinonprotein durch Redoxfärbung nachweisbar. Beim Vergleich des Redoxstaining der oben genannten *E. cannabinum*-Proben mit den prozentualen Anteilen der entstandenen Produkte bei den Inkubationen mit [14 C]Homospermidin als Substrat zeigte sich, dass das Produkt 2 (R_F -Wert von 0,40 im Polyamin-Fließmittel, Fraktionen 5-13 Hydroxylapatit und Fraktion 7-10 bei DEAE-Fractogel) durch ein Chinonprotein entstanden sein könnte. Das Produkt 3 (R_F -Wert: 0,53 im Polyamin-Fließmittel, Fraktionen 7-13 bei Hydroxylapatit und Fraktion 7+10 bei DEAE-Fractogel) wurde nicht durch ein Chinonprotein gebildet. Bei *S. vernalis* war keine eindeutige Aussage möglich, da die Produkt 1 und 2 (R_F -Wert: 0,37 und 0,40, Polyamin-Fließmittel) immer zusammen aufgetreten sind. In den Fraktionen mit einem relativ kleinen Anteil der Produkte 1 und 2 (< 30% nach 20 Stunden Inkubation) war kein Chinonprotein detektierbar.

3.2.5.4. Zusammenfassung

Die Homospermidin-umsetzenden Enzyme aus den PA-Pflanzen *S. vernalis* und *E. cannabinum* konnten an die Hydroxylapatit- und die DEAE-Fractogel-Säule gebunden werden. Mit dem Puffer-B-Gradient-1 ließen sich die Produkt-2- und Produkt-3-bildenden Enzyme des *E. cannabinum*-Wurzelrohextraktes über die Hydroxylapatit-Säule teilweise trennen. Gleiches gilt für den Puffer-B-Gradient-2 bei der DEAE-Fractogel-Säule. Keine Trennung von Homospermidin-umsetzenden Aktivitäten erfolgte bei *S. vernalis*-Wurzelrohextrakten. Die Reinigung bedarf noch weiterer Optimierung. Parallel wurden molekularbiologische Versuche mit degenerierten Primern begonnen, die schon bald viel versprechende Erfolge zeigten (siehe 3.3). Deshalb wurde die Charakterisierung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme der Wurzelrohextrakte durch die FPLC-Reinigung in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

3.2.6. Stabilität

Im Institut lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Erkenntnisse über die Stabilität von kupferhaltigen Aminoxidasen (CAOs) vor. Deshalb wurden Lagerungsversuche mit gefriergetrockneten und eingefrorenen Pflanzenmaterialien (-20°C) sowie Pflanzenrohextrakten durchgeführt. Wenn Pflanzenmaterial oder Rohextrakte ohne Verlust der CAO-Aktivität zu lagern wären, könnten größere Mengen an pflanzlichem Ausgangsmaterial gesammelt und für verschiedene Versuche eingesetzt werden.

3.2.6.1. *Pisum sativum*-Rohextrakte

Als Proben für die *Pisum sativum*-Rohextrakte wurde frisches, bei -20°C gelagertes und gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial verwendet. Der Erbsenrohextrakt von 7 bis 14 Tage alten im Dunkeln gewachsenen, frischen Pflanzen wurde umgepuffert (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH-Wert 7) und bei 4°C sowie -20°C gelagert (siehe 2.12.5). Anschließend wurden die Proben bei 37°C für 5 bis 60 min mit [¹⁴C]Putrescin als Substrat inkubiert und mit Radio-DC vermessen (siehe 2.15.6 und 2.16.1). Es zeigte sich, dass die PSAO (CAO von *P. sativum*) nach drei Wochen Lagerung bei 4°C ihre Aktivität verloren hatte. Die Lagerung eines Rohextraktes für 4 Monate bei -20°C hatte keinen Einfluss auf die Aktivität. Sogar ein einmaliges Auftauen und wieder Einfrieren zeigte keinen Einfluss auf die PSAO-Aktivität. Nach Hill [1972] ist die PSAO nach mehrstufiger Reinigung auch für mehrere Monate bei -20°C ohne Verlust der Aktivität lagerbar. Dies entspricht den hier erhaltenen Ergebnissen. Eine andere Möglichkeit Proteinrohextrakte aufzubewahren, ist die Lagerung nach Gefriertrocknung. Hierfür wurden umgepufferte *P. sativum*-Rohextrakte gefriergetrocknet (siehe 2.12.5.1) und bei -80°C gelagert. Nach einer Woche war noch ein mit der Kontrolle vergleichbarer Putrescinumsatz zu messen, während nach 3 Wochen keine Aktivität zu detektieren war. Somit lässt sich der Rohextrakt nach Gefriertrocknung nicht für längere Zeit lagern. Das Einfrieren von Erbsenkeimlingen für einen Monat bei -20°C und das Gefriertrocknen von Erbsenkeimlingen mit

anschließender Lagerung für einen Monat bei -80°C hatte keinen Einfluss auf die PSAO-Enzymaktivität.

3.2.6.2. *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakte

Drei Tage alte Wurzelorgankulturen von *E. cannabinum* wurden als umgepufferter Rohextrakt (0,1 M Kaliumphosphatpuffer: pH-Wert 7 mit 2 mM DTT) (siehe 2.12.5) nach Gefriertrocknung (siehe 2.12.5.1) bei -80°C oder bei -20°C gelagert. Der Wurzelrohextrakt wurde mit [^{14}C]Homospermidin als Substrat, 0,3 U/ μl Catalase, 0,1 U/ μl ADH und 1 mM NADH für eine bis 20 Stunden bei 30°C inkubiert. Ein mit dem frisch hergestellten Rohextrakt vergleichbarer Stoffumsatz war noch nach zwei Monaten Lagerung zu messen. Eine Lagerung bei -20°C zeigte auch noch nach 6 Monaten Aktivität, die aber geringer als bei der Kontrolle war. Die Aufbewahrung bei -80°C verbesserte die Stabilität der Homospermidin-umsetzenden Enzyme von *E. cannabinum* nicht. Damit war der gefriergetrocknete *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakt bei -20°C bzw. -80°C für zwei Monate ohne Aktivitätsverlust der Homospermidin-umsetzenden Enzyme lagerbar.

3.3. Identifizierung und Isolierung von CAOs-codierenden cDNAs aus *Senecio vernalis*

Als weitere Strategie das Enzym zu identifizieren, das in Pflanzen bei der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese Homospermidin als Substrat umsetzt, wurde ein molekularbiologischer Ansatz ausgewählt. Es wird vermutet, dass es sich bei dem gesuchten Enzym um eine kupferhaltige Aminoxidase (CAO) handelt (siehe Einleitung - Kapitel 0).

3.3.1. PCR mit degenerierten Primern

Die Identifizierung eines Teilstücks einer CAO-homologen Sequenz aus *S. vernalis* erfolgte über eine PCR mit degenerierten Primern. Dazu wurde ein Aminosäure-Alignment von bekannten Pflanzen-CAOs aus der Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) zum Design von degenerierten Primern erstellt. Dabei zeigte sich schon im Vorfeld, dass die Sequenzen keine hohe Ähnlichkeit aufwiesen (um 60-95%). Das Alignment bestand aus zwei *Arabidopsis thaliana*- und zwei Fabaceen-Sequenzen (siehe Abbildung 37). Bei der Konstruktion der degenerierten Primern (siehe 2.9.2.1), die zur Identifizierung von CAO-homologen Teilsequenzen aus *S. vernalis* (siehe Tabelle 25) verwendet wurden, sollte der Grad der Degeneriertheit gering sein. Der an Hand dieses Alignment maximal erreichbar kleinste Grad lag bei 1024fach. Die einzige Ausnahme war Primer SD1-DAO-deg2-FOR (2048fach).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD1-DAO-deg2-FOR	5'-ACN RTN GGN TGG TWY GGN GA-3' degenerierter Primer2 forward T_m : 59,4°C
SD1-DAO-deg3-FOR	5'-TT(Y GTN CCN TAY MWR GAY CC-3' degenerierter Primer3 forward T_m : 56,3°C
SD1-DAO-deg3-REV	5'-GG RTC YWK RTA NGG NAC RAA-3' degenerierter Primer3 reverse T_m : 56,3°C
SD1-DAO-deg4-FOR	5'-RTN WAY CAY GAY CAY TWY-3' degenerierter Primer4 forward T_m : 48,0°C
SD1-DAO-deg4-REV	5'-RWA RTG RTC RTG RTW NAY-3' degenerierter Primer4 reverse T_m : 48,0°C
SD1-DAO-deg5-REV	5'-GG CT NAY NGG RWA RTC YTC YTG-3' degenerierter Primer5 reverse T_m : 61,5°C

Tabelle 25: Degenerierte Primer für *S. vernalis* und *E. cannabinum* dargestellt im IUB-Code.

IUB-Code:

B	C, G oder T	K	G oder T (Ketogruppe)
D	A, G oder T	R	A oder G (Purin-Basen)
H	A, C oder T	Y	T oder C (Pyrimidin-Basen)
V	A, C oder G	S	G oder C (starke Bindung)
N	A, C, G oder T	W	A oder T (schwache Bindung)
		M	A oder C (Aminogruppe)

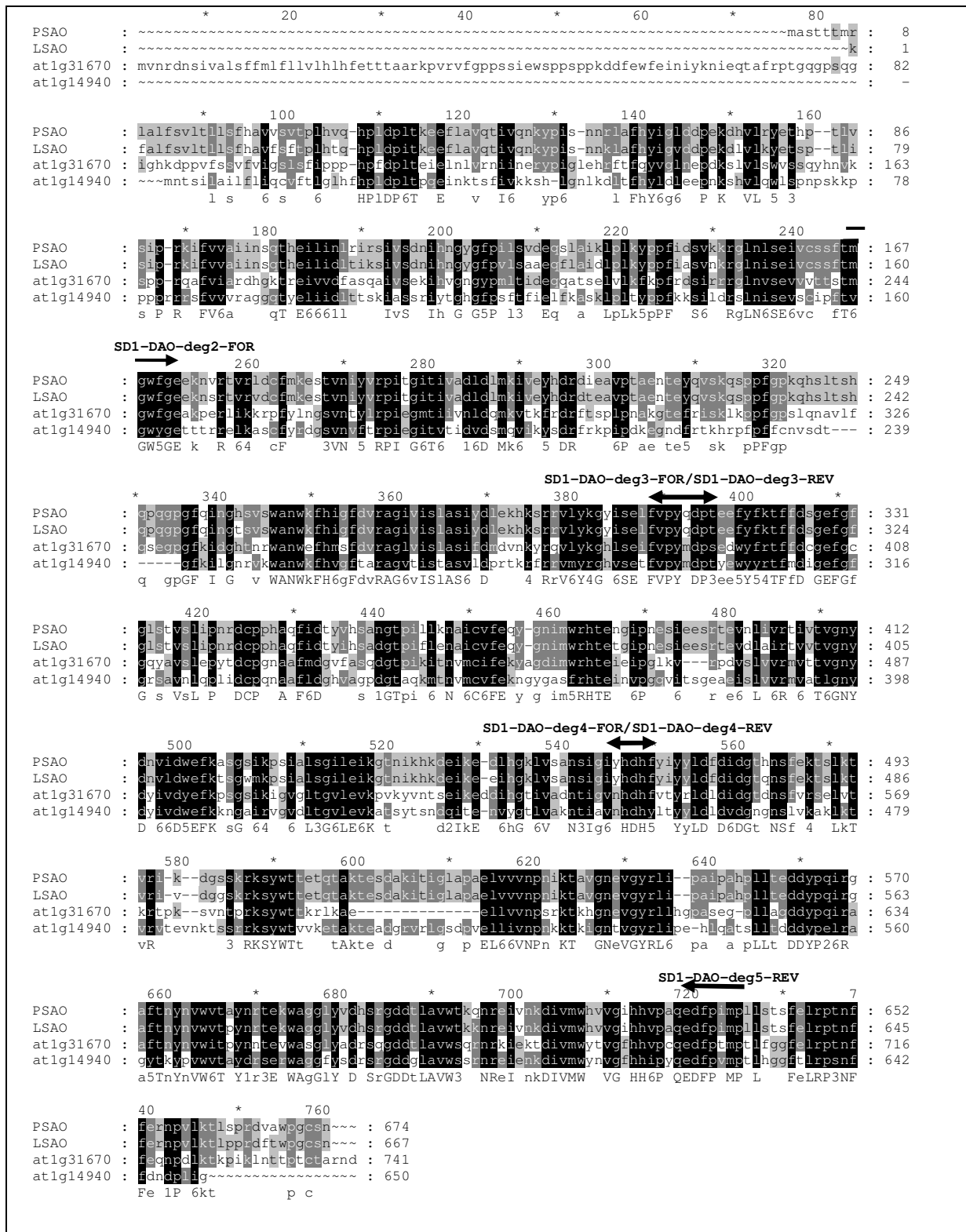


Abbildung 37: Alignment aus CAO-Sequenzen von *Pisum sativum* (PSAO), *Lens culinaris* (LSAO) und *Arabidopsis thaliana* (atlg31670 und atlg14940) aus der Datenbank www.ncbi.nlm.nih.gov zum Design von degenerierten Primern. Pfeile: Lage der degenerierten Primer aus Tabelle 25.

Die gesamte Necinbase-Synthese findet bei *S. vernalis* in den Wurzeln statt (siehe Einleitung - 1.2). Um eine CAO zu finden, die Homospermidin als Substrat umsetzt, wurde deshalb Gesamt-RNA (siehe 2.10.1) aus drei Tage alten Wurzelorgankulturen („Mix-Kultur“) isoliert (siehe 2.7.1) und in cDNA

umgeschrieben (siehe 2.10.3.1). Die PCR wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.1) mit verschiedenen Primer-Kombinationen (siehe Tabelle 26) und Temperaturprogrammen durchgeführt.

	Oligo-dT-Primer (siehe Tabelle 6)	SD1-DAO- deg3-REV	SD1-DAO- deg4-REV	SD1-DAO- deg5-REV
SD1-DAO-deg2-FOR	-	-	-	-
SD1-DAO-deg3-FOR	-	x	-	+
SD1-DAO-deg4-FOR	-	x	x	-

Tabelle 26: Verwendete Primerkombinationen bei der PCR mit degenerierten Primern (Degenerierter Primer forward und degenerierter Primer reverse sowie der Oligo-dT-Primer). Bei x wird auf Grund der Lage der Primer kein Amplifikat erhalten. -: kein positives Ergebnis; +: diese Primerkombination erzeugte ein PCR-Produkt.

Erfolgreich war ein PCR-Programm mit den Primern SD1-DAO-deg3-FOR und SD1-DAO-deg5-REV.

95°C	5 min	} 35 x
95°C	45 sec	
52°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Nach Klonierung eines ca. 835 bp großen PCR-Produktes mit dem TOPO TA Cloning® Kit und Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide mit dem Enzym *Eco*RI wurde eine Sequenz mit den Sequenzierprimern M13uni und M13rev (siehe Tabelle 8) sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit dem gcg-Programm bearbeitet (siehe 2.10.14.2) und durch eine BLAST-Analyse der Aminosäure- bzw. Nucleotidsequenz als erste *S. vernalis*-CAO-homologe Teilsequenz (zusammengesetzt aus **daoSV1_Rmod** (M13rev) und **daoSV1mod** (M13uni)) eindeutig identifiziert (siehe 2.10).

3.3.2. 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Zur Identifizierung des fehlenden 3'-Endes zur CAO-homologen Teilsequenz aus *S. vernalis* (siehe 3.3.1) wurde an Hand der erhaltenen Nucleotidsequenz der internen Teilsequenz der genspezifische Primer SD2-3race1for (siehe Tabelle 27) entworfen (siehe 2.9.2.2).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD2-3race1for	5'-AAG CTA AAA CTA TAT GAC CCA TCT GAA TT-3'
	3'RACE cDNA1 T _m : 59,6°C

Tabelle 27: Genspezifischer Primer 1 für eine 3'RACE der CAO-homologen Sequenz aus *S. vernalis*.

Mit dem genspezifischen Primer SD2-3race1for (siehe Tabelle 27) und dem Oligo dT-Primer (siehe Tabelle 6), der an Poly-A-Schwänze bindet, wurde mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.1) und cDNA als Template, hergestellt aus drei Tage alten *S. vernalis*-Wurzelorgankulturen (siehe 2.10.3.1), eine PCR durchgeführt.

95°C	3 min	} 35 x
95°C	45 sec	
40°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Das etwa 650 bp große Amplifikat wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit kloniert (siehe 2.10.6). Die erhaltenen isolierten Plasmide wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* analysiert (siehe 2.10.12.2) und dann drei Plasmide zum Sequenzieren ausgewählt. Die drei isolierten Plasmide (**3SV7b**, **3SV13mod** und **3SV19mod**) waren zu 97-99% auf Nukleinsäureebene identisch. Beim Sequenzvergleich des 3'-Endes mit der internen Teilsequenz (ohne Sequenzbereich der degenerierten Primer) (siehe 3.3.1) zeigte sich, dass die Identität nur bei 85-89% lag. Dies bedeutete, dass eine neue CAO-Teilsequenz einer neuen Genfamilie gefunden worden war und dass das 3'-Ende zum Mittelteil noch fehlte (siehe 3.3.1). Um das fehlende 3'-Ende zu identifizieren, wurde ein neues Alignment aus der Sequenz des Mittelteils (siehe 3.3.1) und den drei neuen 3'-Enden erstellt und ein neuer genspezifischer Primer SD3-3race2for (siehe Tabelle 28) entworfen.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD3-3race2for	5'-GGA ATC GTG ATA TCG AGA ACA AAG ATA TT-3'
	3'RACE cDNA2 T _m : 61,0°C

Tabelle 28: Genspezifischer Primer 2 für eine 3'RACE der CAO-homologen Sequenz aus *S. vernalis* passend zur internen Sequenz (siehe 3.3.1).

Mit cDNA (siehe 2.10.3.1) als Matrize sowie mit dem Oligo dT-Primer und dem 3'Race-Primer SD3-3race2for wurde eine PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt (siehe 2.10.4.1).

95°C	3 min	} 35 x
95°C	45 sec	
46,4°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Es wurde ein ca. 350 bp großes PCR-Produkt erhalten. Nach Klonierung (siehe 2.10.6) und Restriktionsanalyse (siehe 2.10.12.2) wurden drei Sequenzen (**3SV2-8mod**, **3SV2-17mod** und **3SV2-5**) identifiziert, die nach einer BLAST-Analyse CAO-homologe 3'-Enden codieren. Nach Vergleich der Identitäten der fünf identifizierten 3'-Enden auf Nukleinsäureebene lassen sich diese in zwei Genfamilien einordnen (siehe Tabelle 29). Beim Sequenzvergleich der zwei 3'-Enden der Genfamilie 2 (**3SV2-17mod** und **3SV2-5**) mit der internen Teilsequenz (ohne Sequenzbereich der degenerierten Primer) (siehe 3.3.1) zeigte sich, dass die Identität bei 97,4% (Unterschied in einer Nukleinsäure) und 100% lag. Es war das fehlende 3'-Ende zur internen Teilsequenz identifiziert worden.

Ergebnisse

SD2-3race1for SD2-3race2for	3SV7b (Genfamilie 1)	3SV13mod (Genfamilie 1)	3SV19mod (Genfamilie 1)
3SV2-8mod (Genfamilie 1)	98%	98%	99%
3SV2-17mod (Genfamilie 2)	78%	78%	78%
3SV2-5 (Genfamilie 2)	78%	78%	78%

Tabelle 29: Vergleich von Identitäten auf Nukleinsäureebene der identifizierten 3'-Enden (erhalten mit Primer SD2-3race1for und SD2-3race2for) (siehe 3.3.2). Die Sequenzen 3SV2-17mod und 3SV2-5 der Genfamilie 2 waren zu 98% auf Nukleinsäureebene identisch.

Zur **ersten Genfamilie (cDNA1 aus *S. vernalis* - SVAO1)** gehören die folgenden Sequenzen, die ein CAO-homologes 3'-Ende codieren: **3SV2-8mod, 3SV7b, 3SV13mod und 3SV19mod.**

Die CAO-homologen Teilsequenzen **daoSV_Rmod/daoSV1mod** (Mittelteil), **3SV2-5** und **3SV2-17mod** (3'-Enden) lassen sich einer **zweiten Genfamilie (cDNA2 aus *S. vernalis* - SVAO2)** zuordnen. Bei beiden Genfamilien fehlt das 5'-Ende, da CAOs meist eine Größe von ca. 2 kb besitzen. Die hier gefundenen und zusammengesetzten Sequenzen waren etwa 650 bp (Genfamilie 1) und 1200 bp (Genfamilie 2) groß.

3.3.3. Herstellung einer *S. vernalis*-Klonkultur

Parallel zu den Versuchen eine CAO-homologe Sequenz aus *S. vernalis*-Wurzelorgankulturen („Mixkultur“) zu finden, die schon im Institut vorhanden waren, wurde eine *S. vernalis*-Klonkultur etabliert (siehe 2.7.1). Eine Klonkultur stellte sicher, dass die kultivierten Pflanzenteile von ein und demselben Individuum stammten. So konnte ausgeschlossen werden, dass geringfügige Sequenzunterschiede womöglich aus Unterschieden zwischen zwei Individuen resultieren. Alle weiteren Versuche, CAO-homologe Sequenzen aus *S. vernalis* zu identifizieren, wurden mit der Klonkultur durchgeführt.

3.3.3.1. Klonkultur

Die mit der *S. vernalis*-„Mix-Kultur“ erhaltenen Ergebnisse bezüglich der PCR-Bedingungen (siehe 3.3.1 und 3.3.2) sollten auf die Klonkultur übertragen werden, um so die CAO-homologen Sequenzen auch in der Klonkultur zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass die PCR-Temperaturprogramme mit den degenerierten Primern und bei der 3'RACE keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten. Es wurden keine Amplifikate unter den Bedingungen erhalten und die PCR-Programme mussten neu optimiert werden.

3.3.3.2. PCR mit degenerierten Primern

Die Identifizierung einer internen CAO-homologen Sequenz in der Klonkultur aus *S. vernalis* erfolgte mit den degenerierten Primern aus Tabelle 25 durch verschiedene PCR-Programme. Wie bei der „Mixkultur“ wurde bei der Klonkultur nur mit den Primern SD2-DAO-deg3-FOR und SD2-DAO-deg5-REV ein PCR-Produkt erhalten (siehe 3.3.1). Mit cDNA aus drei Tage alten Wurzelorgankulturen (siehe 2.10.3.1) als Matrize wurde eine PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt (siehe 2.10.4.1).

Ergebnisse

95°C	3 min	} 20 x -0,5°C/Zyklus
95°C	45 sec	
54°C	1 min	
72°C	2 min	
95°C	45 sec	} 20 x
44°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Nach Klonierung und Restriktionskontrolle der isolierten Plasmide (siehe 2.10.6 und 2.10.12.2) mit wurde ein Plasmid zum Sequenzieren ausgewählt. Diese 1007 bp lange Sequenz konnte nach BLAST-Analyse (siehe 2.10.14.2) als CAO-homologes internes Fragment (**deg-6-sv-kw**) der **Genfamilie 2** identifiziert werden.

3.3.3.3. 3' RACE-PCR Genfamilie 2

Zur Identifizierung des 3'-Endes der Genfamilie 2 wurde mit dem SD3-3race2for- und dem Oligo-dT-Primer (siehe Tabelle 6 und Tabelle 28) eine Standard-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase mit drei verschiedenen cDNA-Templates (Blatt, 3 und 7 Tage alte Wurzelorgankulturen) durchgeführt (siehe 2.10.4.1). Alle drei Proben erzeugten ein PCR-Produkt (siehe 2.10.5).

95°C	3 min	} 35 x
95°C	45 sec	
37°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Die zwei etwa 340 bp großen PCR-Produkte (drei Tage alte Wurzel und Blatt) wurden nach Klonierung (siehe 2.10.6) durch Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Bg*/II (siehe 3.3.2) analysiert (siehe 2.10.12.2). Nach Restriktionsanalyse (siehe 2.10.14.2) der CAO-homologen 3'-Enden, die in der „Mix-Kultur“ identifiziert worden waren (siehe 3.3.2), schneidet *Eco*RI die 3'-Enden der Genfamilie 1 und 2 nicht. Durch *Bg*/II werden nur die 3'-Enden der Genfamilie 1 einmal geschnitten. Zwei Plasmide der Blattprobe und ein Plasmid der drei Tage alten Wurzelorgankultur wurden zum Sequenzieren ausgewählt. Diese Plasmide zeigten ein ähnliches Restriktionsmuster wie Plasmide der Genfamilie 2 (3SV2-5 und 3SV2-17mod), die als Kontrolle gleichzeitig bei der Restriktionsanalyse untersucht worden sind. Nur die erhaltene Nucleotidsequenz aus der Wurzelorgankultur (**3sv2-kw5**) stellte sich durch BLAST-Analyse als CAO-homologes 3'-Ende heraus. Sie zeigte eine ca. 97-100% hohe Identität auf Nukleinsäureebene mit den „Mix-Kultursequenzen“ der **Genfamilie 2** (**daoR_mod**, **daoSV1_mod**, **3SV2-5** und **3SV2-17mod**) und eine 100% Identität mit dem internen Fragment der Klonkultur der Genfamilie 2 (**deg-6-sv-kw**) (siehe 3.3.1).

3.3.3.4. 5'RACE (Klonkultur) für Genfamilie 1 und 2

Bis zu diesem Zeitpunkt lagen noch keine Sequenzinformationen zu den 5'-Enden der beiden Genfamilien aus *S. vernalis* vor. Deshalb wurden genspezifische Primer (siehe Tabelle 30) auf Basis eines Alignments aus den bis zu dem Zeitpunkt identifizierten Sequenzen der Mixkultur daoSV1mod und daoSV_Rmod (Genfamilie 1) und den Sequenzen 3SV7bmod, 3SV13mod und 3SV19mod (Genfamilie 2) für eine 5'RACE-PCR entworfen. Die genspezifischen Primer SD3-5race1gsp1 und SD3-5race1gsp2 wurden so entworfen, dass sie an beide Genfamilien spezifisch binden. Nur der dritte Primer SD3-5racegsp3 sollte nur an cDNAs der Genfamilie 1 spezifisch binden (siehe 2.9.2.2). Auf diese Weise sollte das fehlende 5'Ende der beiden Genfamilien durch eine bzw. zwei PCR identifiziert werden. Es wurden die Primer bestellt und die PCR-Versuche mit der Klonkultur durchgeführt, die zwischenzeitlich etabliert worden war.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD3-5race1gsp1	5'-TGG TAT GTG ATG AAA ACC TA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer1 T_m : 51,2°C cDNA1 und cDNA2
SD3-5race1gsp2	5'-ATC ATC TCC TTT GCT TTG AGA TAC CAA AA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer2 T_m : 61,0°C cDNA1 und cDNA2
SD3-5race1gsp3	5'-CGC ACC TGG GAC AAT CTT GTA GCC A-3'
	5'RACE genspezifischer Primer3 T_m : 66,3°C cDNA1

Tabelle 30: Genspezifische Primer für eine 5'RACE von cDNA1 und cDNA2 aus *S. vernalis*.

Der genspezifische Primer SD3-5race1gsp1 wurde für eine cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA, die aus dem Blatt- und der Wurzelorgankulturklonkultur isoliert worden war, bei einer Temperatur von 55°C verwendet (siehe 2.10.3.2). Nach Abbau der Gesamt-RNA wurde die cDNA am 5'-Ende durch die Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase (rTdT) mit einem Oligo-dC-Schwanz verlängert (siehe 2.10.4.2). Diese cDNA wurde als Template für PCRs verwendet. Da mehrere 5'RACE-PCR-Versuche mit der *Taq*-DNA-Polymerase bei den „Mix-Kulturen“ von *S. vernalis* nicht zum Erfolg geführt haben, wurde bei der Klonkultur mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) die PCR durchgeführt. Dieses Enzym-Gemisch besteht aus einer *Taq*-DNA-Polymerase und einer kleinen Menge eines temperaturstabilen „proofreading“ Enzyms (siehe 2.10.4.4), mit dem Templates mit Sekundärstrukturen sowie lange Templates amplifiziert werden können, da höhere Temperaturen bei der PCR möglich sind.

Bei der Wurzelorgankultur-Probe wurde der Abridged-Anchor-Primer (siehe Tabelle 7) und der SD3-5race1gsp2-Primer verwendet. Es wurde ein PCR-Produkt bei einer Annealing-Temperatur von 70,5°C und einer Elongationszeit von 10 min für 35 Zyklen erhalten. Das ca. 2 kb große PCR-Produkt wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit kloniert (siehe 2.10.6). Anschließend wurden isolierte Plasmide (siehe 2.10.9.1) durch *EcoRI*-Restriktionen analysiert (siehe 2.10.12.2), von denen drei ansequenziert wurden (**5sv1-kw10**, **5sv1-kw15** und **5sv1-kw16**). Beim Sequenzvergleich stellte sich

heraus, dass alle drei Nukleinsäuresequenzen zu 98% identisch waren und sie zur **Genfamilie 1** gehören. Die **5sv1-kw10**-Sequenz wurde vollständig sequenziert. Es wurden zwei weitere Teilsequenzen 5sv1-kw10sab1 und 5sv1-kw10sab3 erhalten, die zusammengesetzt mit 5sv1-kw10 die Sequenz **5sv1-kw10gesamt** ergaben. Auffällig war, dass sie am 5'-Ende nicht vollständig war, da ein Start-ATG fehlte. Um das fehlende Start-ATG zu identifizieren, wurde die Sequenz **5sv1-kw16** zusätzlich sequenziert, da sie beim Agarose-Gelcheck (siehe 2.10.5) „optisch größer“ wirkte. Mit der neuen erhaltenen **5sv1-kw10sab3**-Sequenz war das 5'-Ende der Genfamilie 1 identifiziert worden und somit war die cDNA1-Sequenz (SVAO1) vollständig.

Weil keine Bande im Agarosegel bei der Blatt-Probe nach der PCR mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) (siehe 2.10.4.4) sichtbar war, wurde parallel zu den oben genannten Versuchen eine nested PCR mit dem AUAP-Primer (siehe Tabelle 7) und dem SD3-5race1gsp3-Primer (siehe Tabelle 30) bei einer Annealing-Temperatur von 74°C für 35 Zyklen und einer Elongationszeit von 10 min mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) durchgeführt. Nach Klonierung eines 1,9 kb-großen Amplifikats in den PCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor (siehe 2.10.6) und Restriktionsanalyse (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2) wurde nach Sequenzierung eine ca. 760 bp große Nukleinsäuresequenz (**5sv1-kb39g**, nicht vollständig sequenziert) erhalten. Durch Sequenzvergleiche konnte diese Sequenz der **Genfamilie 1** zugeordnet werden. Das 5'-Ende der Genfamilie 1 (SVAO1) konnte somit in dem Blatt und der Wurzelorgankultur von *S. vernalis* nachgewiesen werden.

Da der genspezifische Primer SD3-5race1gsp2 auf beide Genfamilien passen sollte und erst für die Genfamilie 1 das fehlende 5'-Ende identifiziert worden war, sollte durch das Erstellen einer Restriktionskarte von der Sequenz 5sv1-kw10gesamt und durch Restriktionsanalysen (siehe 2.10.14.2) das fehlende 5'-Ende der Genfamilie 2 gefunden werden. Durch *Bam*HI und *Eco*RV-Restriktionen der vorhandenen isolierten Plasmide wurden zwei weitere Plasmide, die ein anderes Restriktionsmuster als der Plasmid 5sv1-kw10gesamt zeigten, zum Ansequenzieren ausgewählt. *Bam*HI und *Eco*RV schneiden die 5sv1-kw10gesamt-Sequenz (5'-Ende des Genfamilie1) einmal. Beide Sequenzen (**5sv1-kw6** und **5sv1-kw17**) waren zu 99% auf Nukleinsäureebene identisch und gehörten zur **Genfamilie 2**. Die etwa 1900 bp große Sequenz 5sv1-kw6 wurde vollständig sequenziert. Die neuen Teilsequenzen 5sv1-kw6rev und 5sv1-kw6sab5 wurden mit der Sequenz 5sv1-kw6 zu der Sequenz **klon6gesamt** zusammengesetzt. Klon6gesamt hatte eine 99% Identität auf Nukleinsäureebene im Überlappungsbereich der Sequenz des internen Fragments (deg-6-sv-kw, siehe 3.3.3.2) der Genfamilie 2. Damit wurde das 5'-Ende der Genfamilie 2 erhalten und die cDNA2-Sequenz (SVAO2) war vollständig identifiziert.

3.3.3.5. 3'RACE-PCR Genfamilie 1

Um das 3'-Ende der Genfamilie 1 zu bestätigen, das in der „Mixkultur“ von *S. vernalis* gefunden worden war (siehe 3.3.2) und das zum 5'-Ende der Sequenz 5sv1-kw10gesamt (Genfamilie 1) aus der Klonkultur passt (siehe 3.3.3.4), wurde eine PCR (siehe 2.10.4.1) mit dem genspezifischen Primer SD2-3race1for (siehe Tabelle 27) und dem Oligo-dT-Primer (siehe Tabelle 6) durchgeführt. Als

Template wurde cDNA verwendet, die aus Gesamt-RNA isoliert aus der Wurzelorgankultur und dem Blatt von *S. vernalis* (Klonkultur) hergestellt worden war (siehe 2.10.1 und 2.10.3.1).

95°C	3 min	} 35 x
95°C	45 sec	
40°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Ein PCR-Produkt wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase nur bei der Wurzelorgankultur-Probe erhalten (siehe 2.10.4.1). Das 590-630 bp große Amplifikat wurde in den PCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert (siehe 2.10.6). Um das gesuchte 3'-Ende oder noch eine neue Genfamilie zu finden, wurden auf Grund der bis zu diesem Zeitpunkt identifizierten Sequenzen, die für CAO-homologe 3'-Enden codieren, Restriktionskarten erstellt (siehe 2.10.14.2). Die isolierten Plasmide (siehe 2.10.9.2) wurden mit *Bgl*II, *Eco*RI und *Eco*RV geschnitten (siehe 2.10.12.2), von denen dann zwei zum Sequenzieren ausgewählt wurden. *Bgl*II und *Eco*RV schneiden die gefundenen 3'-Enden der „Mix-Kultur“ (Genfamilie 1) einmal und *Eco*RI schneidet diese Sequenzen nicht. Die zwei ausgewählten Plasmide zeigten ein ähnliches Restriktionsmuster wie die Plasmide der „Mix-Kultur“ 3SV2-8mod, 3SV7b, 3SV13mod und 3SV19mod der Genfamilie 1, die als Kontrolle gleichzeitig bei der Restriktionsanalyse untersucht worden sind. Beide Sequenzen (**3sv1-kw3** und **3sv1-kw4**) gehörten zur **Genfamilie 1** (Identität: 99% Nukleinsäureebene). Der Nukleinsäurebereich, der mit der Sequenz des 5'-Endes der Genfamilie 1 überlappt (5sv1-kw10gesamt, siehe 3.3.3.4), zeigte eine 99% Identität. Die Sequenz des 3'-Endes der Genfamilie 1 aus der „Mixkultur“ wurde somit auch in der Klonkultur von *S. vernalis* identifiziert.

3.3.3.6. Stoppcodon-Analyse bei Genfamilie 1 und Leserahmenverschiebung der Genfamilie 2

Nach dem Zusammensetzen (siehe Tabelle 35) der cDNA1 (SVAO1 – Genfamilie 1) aus *S. vernalis* aus den Sequenzen 5sv1-kw16sab3, 5sv-kw10gesamt und 3sv1-kw3 (siehe 3.3.3.4 und 3.3.3.5) und dem Zusammensetzen der cDNA2 (SVAO2 – Genfamilie 2) aus *S. vernalis* aus den Sequenzen klon6gesamt, deg-6-sv-kw und 3sv2-kw5 (siehe 3.3.3.2, 3.3.3.3 und 3.3.3.4) stellte sich heraus, dass bei der SVAO1-Sequenz ein Stoppcodon vor dem mutmaßlichen Start-ATG vorhanden war (siehe Abbildung 38) und bei der SVAO2-Sequenz eine Leserahmenverschiebung auftrat (siehe Abbildung 39). Bei der SVAO1-Sequenz konnte die Sequenz entweder noch nicht vollständig identifiziert worden sein oder es konnte ein Sequenzierfehler vorgekommen sein, so dass eine Leserahmenverschiebung aufgetreten war. Das Start-Codon wäre noch nicht identifiziert worden. Eine Expression dieser Sequenzen mit einem nicht korrekten offenen Leserahmen würde nicht funktionieren. Deshalb wurden an Hand der vorliegenden Sequenzen genspezifische Primer (siehe 2.9.2.2) entworfen, die zur Überprüfung der vorliegenden Sequenzen auf Fehler dienten (siehe Tabelle 29).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD6-gsp1	5'-ATA GGA ATG TCT CGA CC-3'
	RT-Reaktion Stoppcodon-Check T_m : 50,4°C cDNA1 und cDNA2
SD6-sv1for	5'- TTTAAAGAATTC ACA ATT TAT TCA AGA GAG-3'
	Stoppcodon-Check T_m : 57,2°C cDNA1 forward
SD6-sv1rev	5'-TCA TAC TTT GTT AAC ATC GGG TAA CCA-3'
	Stoppcodon-Check T_m : 60,4°C cDNA1 reverse
SD6-sv2for	5'-CCT TAC CCG AAA TCA ACA AGA TTC GAT-3'
	Stoppcodon-Check T_m : 61,9°C cDNA2 forward
SD6-sv2rev	5'-CTA CAT CCA CAG TGA TGG TTA ACC CT-3'
	Stoppcodon-Check T_m : 63,2°C cDNA2 reverse

Tabelle 31: Primer für Stoppcodon-Check von cDNA1 (SVAO1) und der Analyse der Leserahmenverschiebung von cDNA2 (SVAO2) aus *S. vernalis*. Der Adapter von Primer SD6-sv1for ist fett gedruckt dargestellt.

Adapter SD6-sv1for	
	ACAATTATTCAAGAGAGTTAGAAT ATG AGGAAATATTTTGTGCTCAATTCTTCATTAT
1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
	TGTTAAATAAGTTCTCTCAATCTTATACTCCTTTATAAAAAACACGAGTTAAGAAGTAATA
b	Q F I Q E S * N M R K Y F C A Q F F I I -
	CATTGCTGTTACAGTTTTTATAACTACATACTCAAACATTGGATGTGCCACCTTTAAGTT
61	-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
	GTAACGACAATGTCAAAAATATTGATGTATGAGTTTGTAACTACACGGTGGAATTCAA
b	I A V T V F I T T Y S N I G C A T F K L -
	⋮
	TGGTCAAACCATCTTGTGACGGTTGACTTGGAGGCGGGCCTTGTGATAGATCATGATGT
421	-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
	ACCAGTTTTGGTAGAACACTGCCAACTGAACCTCCGCCCGAACACTATCTAGTACTACA
b	G Q N H L V T V D L E A G L V I D H D V -
	SD6-sv1rev
	GAAAGACGCGTCTGGTTACCCGATGTTAACAAGTATGACCTGCATAGGGCTATAGGGGT
481	-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
	CTTTCTGCGCAGACCAATGGGCTACAATTGTTTCATACTGGACGTATCCCGATATCCCCA
b	K D A S G Y P M L T K Y D L H R A I G V -
	⋮

Abbildung 38: Teilausschnitt der SVAO1-Sequenz aus *S. vernalis* (cDNA1 – Genfamilie 1) - nach dem Zusammensetzen der Teilsequenzen 5sv1-kw16sab3, 5sv-kw10gesamt und 3sv1-kw3. Es ist ein Stoppcodon an Position 19 bp vorhanden (Kasten). Die Lage der Primer SD6-sv1for und SD6-sv1rev (siehe Tabelle 31) zum Stoppcodon-Check sind durch Pfeile gekennzeichnet.

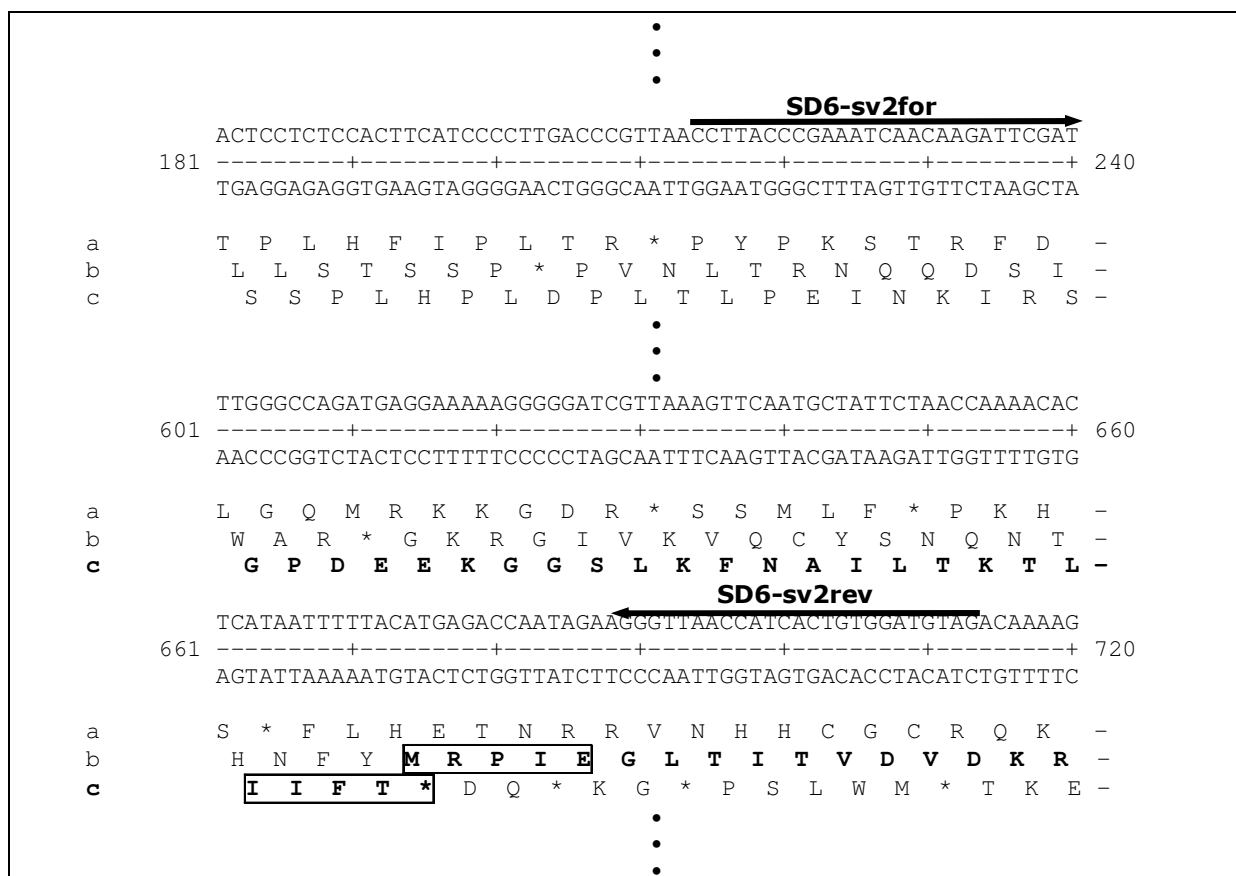


Abbildung 39: Teilausschnitt der SVAO2-Sequenz aus *S. vernalis* (cDNA2 – Genfamilie 2) - nach dem Zusammensetzen der Teilsequenzen klon6gesamt, deg-6-sv-kw und 3sv2-kw5. Es ist eine Leserahmenverschiebung von Leserahmen 3 nach Leserahmen 2 aufgetreten. Die Lage der Primer SD6-sv2for und SD6-sv2rev (siehe Tabelle 31) zur Kontrolle des Leserahmens sind durch Pfeile dargestellt.

Es wurde der genspezifische Primer SD6-gsp1 entworfen, der spezifisch an beide Sequenzen binden sollte. Mit diesem erfolgte die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA, die aus der Wurzelorgankultur von *S. vernalis* (siehe 2.10.3.1) isoliert worden war. Nach dem Umschreiben sollte cDNA der beiden Genfamilien vorliegen. Mit dieser cDNA als Template wurde jeweils eine Standard-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase mit der Primerkombination SD6-sv1for und SD6-sv1rev für die cDNA1 und mit der Primerkombination SD6-sv2for und SD6-sv2rev für die cDNA2 durchgeführt (siehe 2.10.4.1).

cDNA1 - SVAO1	cDNA2 – SVAO2		
95°C	95°C	3 min	
95°C	95°C	45 sec	} 20 x -0,5°C/Zyklus
61°C	71°C	1 min	
72°C	72°C	2 min	
95°C	95°C	45 sec	} 20 x
51°C	61°C	1 min	
72°C	72°C	2 min	
72°C	72°C	10 min	
15°C	15°C	∞	

Nach Klonierung der beiden ca. 500 bp großen Amplifikate mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (siehe 2.10.6) und anschließender Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Bsp*HI bei der cDNA1 sowie *Eco*RI

und *BsaI* bei der cDNA2 (siehe 2.10.12.2) wurden drei isolierte Plasmide sequenziert (siehe 2.10.9.2). Bei der cDNA1 wurde das Stoppcodon durch die neue Sequenz (gen1-svA) bestätigt (siehe Abbildung 38). Durch den Vergleich der neuen beiden Sequenzen (gen2-sv3 und gen2-sv6) mit der SVAO2-Sequenz stellte sich heraus, dass ein Adenosin an Position ca. 617 bp fehlte. Nach dem Einfügen dieser fehlenden Base, war ein durchgängiger Leserahmen 3 vorhanden.

3.3.3.7. Genfamilie 3 – PCR mit degenerierten Primern

Da durch Literatur-Recherche bekannt war [Tiburcio et al., 1997; Hogdall et al., 1998; Delis et al., 2006; Eller et al., 2006], dass in einer Pflanze nicht nur eine CAO vorhanden sein muss, sondern auch mehrere vorliegen können, wurde durch eine weitere PCR mit den degenerierten Primern SD1-DAO-deg3-FOR und SD1-DAO-deg5-REV (siehe Tabelle 25) versucht, eine neue unbekannte CAO-homologe Teilsequenz aus *S. vernalis* zu finden. Es wurde aus den Blättern der Klonkultur Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.1 und 2.10.3.1). Mit dieser Matrize wurde eine Standard-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.1) und den oben genannten Primern durchgeführt.

95°C	3 min	} 20 x -0,5°C/Zyklus
95°C	45 sec	
58,1°C	1 min	
72°C	2 min	
95°C	45 sec	} 20 x
48,1°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Ein ca. 1010 bp großes PCR-Produkt wurde in den PCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor (siehe 2.10.6) kloniert (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2). Ein durch Restriktionsanalyse getestetes, isoliertes Plasmid wurde zum Sequenzieren ausgewählt (siehe 2.10.14.2), da dieses durch *EcoRI* im Gegensatz zu den Sequenzen der Genfamilie 1 und Genfamilie 2 einmal geschnitten wurde. Die neue Sequenz (**degsv-kb3gesamt**) zeigte eine ca. 68% Identität auf Nukleinsäureebene zu den beiden Genfamilien 1 und 2. Sie wurde durch BLAST-Analyse die Sequenz als neue CAO-homologe Teilsequenz und somit zugehörig zur neuen Genfamilie 3 identifiziert (siehe 2.10.14). Diese Teilsequenz wurde auch durch PCR-Versuche mit cDNA identifiziert, die aus isolierter Gesamt-RNA der Wurzelorgankultur von *S. vernalis* hergestellt worden war (Sequenz: **deg-5-sv-kw**). Damit wurde die Genfamilie 3 in der Wurzel und im Spross von *S. vernalis* als Transkript nachgewiesen.

3.3.3.8. 3'RACE – Genfamilie 3

Zur Identifizierung des fehlenden 3'-Endes der cDNA3 (SVAO3 - Genfamilie 3) wurde ein genspezifischer Primer auf Basis eines Alignments aus den Nukleinsäuresequenzen der SVAO1, der SVAO2 und dem Mittelstück degsv-kb3gesamt entworfen (siehe 2.9.2.2). Es sollten in dem Oligonucleotid möglichst wenige Übereinstimmungen zu den beiden anderen cDNAs der Genfamilie

1 und 2 vorhanden sein, so dass dieser Primer spezifisch an die cDNA3-Sequenz der neuen Genfamilie 3 bindet.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD5-3race3for	5'-GAG AAT TCA TTT GTC AAA GTA AAC ATC AA-3'
	cDNA3 T_m : 58,2°C

Tabelle 32: Genspezifischer Primer 3 für 3'RACE von cDNA3 aus *S. vernalis*.

Als Template für die PCR wurde eine cDNA verwendet, die aus isolierter Gesamt-RNA vom Blatt und von drei Tage alten Wurzelorgankulturen hergestellt worden war (siehe 2.10.1 und 2.10.3.1). Mit der *Taq*-DNA-Polymerase und dem Oligo-dT-Primer (siehe Tabelle 6) und dem SD5-3race3for-Primer (siehe Tabelle 32) wurde nach folgendem PCR-Programm ein ca. 590 bp großes PCR-Produkt im Blatt bzw. in der Wurzelorgankultur erhalten (siehe 2.10.4.1):

95°C	3 min	} 20 x -0,5°C/Zyklus
95°C	45 sec	
56°C (Blatt)	1 min	
53°C (WOK)		
72°C	2 min	
95°C	45 sec	} 20 x
46°C (Blatt)	1 min	
43°C (WOK)		
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Nach Klonierung der beiden PCR-Produkte mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (siehe 2.10.6) wurden zwei Plasmide der Blattprobe und ein Plasmid der Wurzelprobe (siehe 2.10.12.2) nach Restriktionsanalyse zum Sequenzieren ausgewählt (siehe 2.10.9.4). Ca. 99,4% Identität auf Nukleinsäureebene betrug der überlappende Sequenzbereich der neuen Sequenzen aus dem Blatt (**3sv3-kb7** und **3sv3-kb11**) zum internen Fragment der cDNA3 (degsv-kb3gesamt, siehe 3.3.3.7). Die erhaltene Sequenz der Wurzelorgankultur (**3sv3-8**) zeigte eine 99,8% Identität auf Nukleinsäureebene zu den Sequenzen 3sv3-kb7 und 3sv3-kb11. Damit war auch das 3'-Ende der Genfamilie 3 im Blatt und in der Wurzelorgankultur von *S. vernalis* identifiziert worden.

3.3.3.9. 5'RACE – Genfamilie 3

Es wurde ein Alignment aus den Sequenzen der Genfamilie 1 und 2 (SVAO1 und SVAO2) sowie den Sequenzen der Genfamilie 3, dem internen Fragment (degsv-kb3gesamt) und den 3'-Enden (3sv3-kb7 und 3sv3-kb11) erstellt, um durch Design von genspezifischen Primern das fehlende 5'-Ende der cDNA3 durch eine 5'RACE-PCR zu identifizieren (siehe 2.9.2.2).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD7-5raceBLgsp1	5'-CGG TTG TTT CAC GCT TGA T-3'
	5'RACE genspezifischer Primer1 T_m : 54,5°C cDNA3
SD7-5raceBLgsp2	5'-TTA CTT CAC GTA TCT CCA TTC CGG TTA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer2 T_m : 61,9°C cDNA3
SD7-5raceBLgsp3	5'-TAC CGT GAA GAT TTT CCG GAT GTT TTA C-3'
	5'RACE genspezifischer Primer3 T_m : 62,2°C cDNA3
SD7-5raceBlgsp1b	5'-CTT GAT GTT TAC TTT GAC AAA T-3'
	5'RACE genspezifischer Primer1b T_m : 50,9°C cDNA3
SD7-5raceBlgsp4	5'-GCC ACA GAA GCT GCC ATC CTT ACT A-3'
	5'RACE genspezifischer Primer4 T_m : 64,6°C cDNA3

Tabelle 33: Genspezifische Primer für 5'RACE für cDNA3 aus *S. vernalis*.

Es wurde Gesamt-RNA aus der Wurzel sowie aus dem Blatt der *S. vernalis*-Klonkultur isoliert (siehe 2.10.1) und mit Hilfe des genspezifischen Primers SD7-5raceBlgsp1 (siehe Tabelle 33) in cDNA (siehe 2.10.3) bei 55°C umgeschrieben. Die getailte cDNA (siehe 2.10.4.2) wurde als Matrize bei einer PCR eingesetzt. Dabei wurden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase sowie mit dem mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) verschiedene PCR-Temperaturprogramme getestet (siehe 2.10.4.1 und 2.10.4.3). Auch wurden die genspezifischen Primer SD7-5raceBLgsp1, SD7-5raceBLgsp2 und SD7-5raceBLgsp3 mit dem Abridged-Anchor-Primer und dem Abridged-Universal-Amplification-Primer (siehe Tabelle 33 und Tabelle 7) in den unterschiedlichsten Kombinationen bei der PCR eingesetzt. Keiner der Versuche führte zu einem Amplifikat. Dies konnte an nicht vollständig denaturierter mRNA liegen (Sekundärstrukturbildung), wodurch ein Umschreiben in cDNA bei der RT-Reaktion nicht erfolgen kann, da die Primer nicht binden können. Deshalb wurde eine andere Reverse-Transcriptase, die Durascript (Enhanced Avian Reverse Transcriptase, Sigma) zur cDNA-Herstellung ausgewählt (siehe 2.10.3.3). Dieses Enzym ist bei höheren Temperaturen einsetzbar, wodurch die Auflösung von Sekundärstrukturen begünstigt wird. Zusätzlich wurden zwei neue genspezifische Primer SD7-5raceBlgsp1b und SD7-5raceBlgsp4 (siehe Tabelle 33) auf Basis des Alignments (siehe 3.3.3.9) entworfen, um so weitere genspezifische Oligonucleotide zu haben (siehe 2.9.2.2). Es wurde neue Gesamt-RNA aus dem Blatt der Klonkultur von *S. vernalis* isoliert und 2 µg mit Hilfe der Durascript (Sigma) bei 55°C mit dem genspezifischen Primer SD7-5raceBlgsp1b in cDNA umgeschrieben. Die getailte cDNA (siehe 2.10.4.2) diente als Matrize für eine PCR mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) (siehe 2.10.4.4), dem genspezifischen Primer SD7-5raceBLgsp3 und dem Abridged-Anchor-Primer (siehe Tabelle 7).

95°C	3 min	} 35 x
94°C	30 sec	
75°C	1 min	
68°C	10 min	
68°C	10 min	
15°C	∞	

Da keine PCR-Bande nach Agarosegelelektrophorese zu sehen war (siehe 2.10.5), wurde das PCR-Gemisch 1/100 mit Wasser verdünnt und als Matrize für eine semi-nested-PCR mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) (siehe 2.10.4.4), dem genspezifischen Primern SD7-5raceBlgsp4 und dem Abridged-Anchor-Primer eingesetzt.

95°C	3 min	} 35 x
94°C	30 sec	
73°C	1 min	
68°C	10 min	
68°C	10 min	
15°C	∞	

Ein ca. 1100 bp großes Amplifikat wurde in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert (siehe 2.10.6) und nach Restriktionsanalyse (siehe 2.10.7) wurden zwei Plasmide sequenziert (**5sv3-kb10** und **5sv3-kb14**). Beide zeigten auf Nukleinsäureebene eine ca 99% Identität im Bereich des überlappenden Sequenzbereichs des internen Fragment (degsv-kb3gesamt, siehe 3.3.3.7) der Genfamilie 3 und 99% untereinander. Beim Vergleich der zusammengesetzten Sequenz der Genfamilie 3 (internes Fragment (degsv-kb3gesamt) und 5'-Ende (**5sv3-kb10gesamt**)) (siehe Tabelle 38) mit den Sequenzen SVAO1 und SVAO2 der beiden Genfamilien 1 und 2 fiel auf, das zum 5'-Ende ca. 500 bp einschließlich des Start-ATG bei der cDNA3 der Genfamilie 3 fehlten. Diese fehlenden Nucleotide sollten durch eine weitere 5'RACE mit neuen genspezifischen Primern, die durch ein Alignment aus den Sequenzen SVAO1, SVAO2 und den neuen Sequenzen 5sv3-kb10 und 5sv3-kb14 entworfen wurden, identifiziert werden (siehe 2.9.2.2).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD9-5raceSV3sp1	5'-AAC CTT CGG TTT TCC TCT TT-3'
	5'RACE genspezifischer Primer1 Tm: 53,2°C cDNA3 (2)
SD9-5raceSV3gsp2	5'-AAC CAC CCA AGC GAA ATT GGC AAA CA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer2 Tm: 63,2°C cDNA3 (2)
SD9-5raceSV3gsp3	5'-CCA CGT GCC ATG ATC GTA CGG TTA AA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer3 Tm: 64,8°C cDNA3 (2)

Tabelle 34: Genspezifische Primer zum Identifizieren der restlichen 500 bp am 5'-Ende von cDNA3 aus *S. vernalis*.

Es wurde Gesamt-RNA aus einem Blatt der Klonkultur isoliert und mit dem genspezifischen Primer SD9-5raceSV3gsp1 (siehe Tabelle 34) und der Superscript III bei 55°C in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.1 und 2.10.3.2). Nach dem Anhängen eines Poly-C-Schwanzes an das 5'-Ende der cDNA (siehe 2.10.4.2) wurde eine PCR mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) (siehe 2.10.4.4) mit dem Abridged-Anchor-Primer und dem genspezifischen Primer SD9-5raceSV3gsp2 (siehe Tabelle 7 und Tabelle 34) durchgeführt.

Ergebnisse

95°C	3 min	}	35 x
94°C	30 sec		
50°C	1 min		
68°C	10 min		
68°C	10 min		
15°C	∞		

Ein ca. 620 bp großes PCR-Produkt wurde erhalten, das PCR-Reaktionsgemisch 1/100 mit Wasser verdünnt und für eine semi-nested PCR mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) mit dem genspezifischen Primer SD9-5raceSV3gsp3 und dem Abridged-Anchor-Primer verwendet (siehe Tabelle 7 und Tabelle 34). Durch eine semi-nested PCR sollte eine erhöhte Spezifität erreicht und Nebenprodukte ausgeschlossen werden.

95°C	3 min	}	35 x
94°C	30 sec		
61°C	1 min		
68°C	10 min		
68°C	10 min		
15°C	∞		

Ein etwa 590 bp großes Amplifikat wurde kloniert (siehe 2.10.6), isolierte Plasmide mit durch Restriktionsanalyse überprüft (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2) und zwei Plasmide (**5race3-kb9a** und **5race3-kb10a**) mit dem M13rev-Sequenzierprimer sequenziert (siehe Tabelle 8). Diese ca. 500 bp langen Sequenzabschnitte zeigten eine ca. 98% Identität auf Nukleinsäureebene zum 5'Ende **5sv3-kb10gesamt** (siehe oben) der Genfamilie 3 (siehe 3.3.3.7) und 99% zueinander. Durch Sequenzieren mit dem M13uni-Sequenzierprimer (siehe Tabelle 8) wurde der Sequenzabschnitt 5race3-kb10arev erhalten. Dieser wurde mit der 5race3-kb10a-Sequenz zu **5race3-kb10gesamt** (siehe Tabelle 38) zusammengesetzt. Damit war das 5'Ende der cDNA3 (SVAO3) aus *S. vernalis* vollständig identifiziert worden.

Nach dem Zusammensetzen der 5sv3-kb10gesamt-Sequenz (siehe oben) und dem internen Fragment degsv-kb3gesamt (siehe 3.3.3.7) der Genfamilie 3 zeigte sich, dass eine Insertation von 203 Nucleotiden vorhanden war (siehe Abbildung 40). Beim Übersetzen der Nucleotidsequenz in die zugehörige Aminosäuresequenz trat eine Leserahmenverschiebung auf, die durch Weglassen dieser Insertion behoben werden konnte. Eine Möglichkeit könnte sein, dass es sich um ein Pseudogen handelt. Pseudogene können nach Bown et al. [1985] relativ große Insertionen und Deletionen besitzen. Eine andere Alternative wäre, dass ein Teil genomischer DNA mit der Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, so dass ein Intron in der cDNA vorhanden war. Auch könnte es sich auch um eine Splicing-Variante handeln. Durch Splicing werden Introns aus der mRNA herausgeschnitten und Exons miteinander durch Ligation am Splicisom verknüpft. Es sind hoch konservierte GU- und AG-Dinucleotide, an denen das 5'- und 3'-Splicing stattfindet. In dicotylen Pflanzen sind Introns AU- und Exons CG/AG-reich [Brown und Simpson, 1998]. Die zweite Möglichkeit ist wahrscheinlich erfolgt, da die interne Sequenz (degsv-kb3gesamt) ohne das Intron

erhalten wurde und nur bei der 5'RACE-Sequenz dieser TeilNukleinsäuresequenz zusätzlich gefunden wurde. Ein Splicing ist offenbar nicht erfolgt.

5sv3-kb10g	: GAAATGTAATGTATAAAGGTTTACTTCGGAACATTTTGTCTGTATATGGACCCTACCGACGCTTGGTACTTTAAAACC	: 641
degsv-kb3g	: -----TTTGTGCTTATATGGACCCTACCGACGCTTGGTACTTTAAAACC	: 45
5sv3-kb10g	: TATATGGATGCTGGGGAATATGGGTTTCGGGCTTCAGGCTATGCCGCTTGACCCGCTTAATGATTGTCCACGTAACGCCTA	: 721
degsv-kb3g	: TATATGGATGCTGGGAATATGGGTTTCGGGCTTCAGGCTATGCCGCTTGACCCGCTTAATGATTGTCCACGTAACGCCTA	: 125
5sv3-kb10g	: TTACATGGATGGTGTGTTTTCGGGCTGGTGACGGAAGCCTACGTTTCGATCAAATATGGTTTGTGTATATGAGAGTTACG	: 801
degsv-kb3g	: TTACATGGATGGTGTGTTTTCGGGCTGGTGACGGAAGCCTACGTTTCGATCAAATATGGTTTGTGTATATGAGAGTTACG	: 205
5sv3-kb10g	: CTGGAGATATCGGGTGGCGACACTCGGAGAGCCCGATAACCGGAATGGAGGTAACATACCATAAAATCAATCTTAATAAC	: 881
degsv-kb3g	: CTGGAGATATCGGGTGGCGACACTCGGAGAGCCCGATAACCGGAATGGAG-----	: 255
5sv3-kb10g	: TAATATCGACCTAATAACATGATCATGACACTTTATAACTTAGATTAAAAAGTTGTACATAGTGCCTAAATAGTTGTAAG	: 961
degsv-kb3g	: -----	: -
5sv3-kb10g	: CTCTGGAAGGTAATGCTTATAGGAAATGTCGCCAACCTTGATTTTTTAAATTCAGATAGTGACAAAATATTATTGTCA	: 1041
degsv-kb3g	: -----	: -
5sv3-kb10g	: TTGGAATTTATACATACGTGAAGTAAGACCAAAGGTGACGTTAGTAGTAAGGATGGCAGCTTCTGTGGC-----	: 1110
degsv-kb3g	: -----ATACGTGAAGTAAGACCAAAGGTGACGTTAGTAGTAAGGATGGCAGCTTCTGTGGCTAATTATGATT	: 322
5sv3-kb10g	: -----	: -
degsv-kb3g	: ATATTGTTGATTGGGAGTTTCAAACCGATGGATTGATCCGAATCAAGGTTGGGCTTAGTGGAATCTTGATGGTGAAAGGC	: 402

Abbildung 40: Nukleinsäuresequenz-Alignment aus der 5'RACE-Sequenz 5sv3-kb10gesamt mit dem Mittelteil degsv-kb3gesamt (hier abgekürzt: 5sv3-kb10g und degsv-kb3g). Der Intronbereich (Insertion) ist dick unterstrichen und fett gedruckt dargestellt. Das konservierte GT-5'-Splicing-Nucleotid und das AG-3'-Splicing-Nucleotid sind fett gedruckt und mit einem Kasten versehen. Es gibt UA-reiche und U-reiche Elemente vor einer 3'-Splicing-Stelle [Simpson et al., 1996; Brown und Simpson, 1998].

3.3.3.10. Zusammenfassung der aus *S. vernalis* identifizierten Sequenzen

Sequenzname	Sequenzier primer	Gen- familie	Gesamt-RNA- Isolierung aus	
3SV7b (siehe 3.3.2)	M13rev	1	Wurzel-Mixkultur	3'-Ende
3SV13mod (siehe 3.3.2)	M13rev	1	Wurzel-Mixkultur	3'-Ende
3SV19mod (siehe 3.3.2)	M13rev	1	Wurzel-Mixkultur	3'-Ende
3SV2-8mod (siehe 3.3.2)	M13rev	1	Wurzel-Mixkultur	3'-Ende
3SV2-17mod (siehe 3.3.2)	M13rev	2	Wurzel-Mixkultur	3'-Ende
3SV2-5 (siehe 3.3.2)	M13rev	2	Wurzel-Mixkultur	3'-Ende
daoSV1_Rmod (siehe 3.3.1)	M13uni	2	Wurzel-Mixkultur	Mittelteil
daoSV1mod (siehe 3.3.1)	M13rev	2	Wurzel-Mixkultur	Mittelteil
deg-6-sv-kw (siehe 3.3.3.2)	M13rev	2	Wurzel-Klonkultur	Mittelteil
3sv2-kw5 (siehe 3.3.3.3)	M13rev	2	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
5sv1-kw6 (siehe 3.3.3.4) 5sv1-kw6rev 5sv1-kw6sab5 zusammengesetzt: klon6gesamt	M13rev M13uni sab5	2	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende
5sv1-kw17 (siehe 3.3.3.4)	M13rev	2	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende (Teil)
5sv1-kw10 (siehe 3.3.3.4) 5sv1-kw10sab1 5sv1-kw10sab3 zusammengesetzt: 5sv1-kw10gesamt	M13rev sab1 sab3	1	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende
5sv1-kw15 (siehe 3.3.3.4)	M13rev	1	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende (Teil)
5sv1-kw16 (siehe 3.3.3.4) 5sv1-kw16sab3 (siehe 3.3.3.4)	M13rev sab3	1	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende (Teil)
5sv1-kb39g (siehe 3.3.3.4)	M13rev	1	Blatt-Klonkultur	5'-Ende (Teil)
3sv1-kw3 (siehe 3.3.3.5)	M13rev	1	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
3sv1-kw4 (siehe 3.3.3.5)	M13rev	1	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
degsv-kb3for (siehe 3.3.3.7) degsv-kb3rev zusammengesetzt: degsv-kb3gesamt	M13uni M13rev	3	Blatt-Klonkultur	Mittelteil
deg-5-sv-kw (siehe 3.3.3.7)	M13rev	3	Wurzel-Klonkultur	Mittelteil
3sv3-kb7 (siehe 3.3.3.8)	M13rev	3	Blatt-Klonkultur	3'-Ende
3sv3-kb11 (siehe 3.3.3.8)	M13rev	3	Blatt-Klonkultur	3'-Ende
3sv3-8 (siehe 3.3.3.8)	M13rev	3	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
5sv3-kb10 (siehe 3.3.3.9) 5sv3-kb10sd1 zusammengesetzt: 5sv3-kb10gesamt	M13rev sd1	3	Blatt-Klonkultur	5'-Ende
5sv3-kb14 (siehe 3.3.3.9)	M13rev	3	Blatt-Klonkultur	5'-Ende (Teil)
5race3-kb9a (siehe 3.3.3.9)	M13rev	3	Blatt-Klonkultur	5'-Ende (Teil)
5race3-kb10a (siehe 3.3.3.9) 5race3-kb10arev zusammengesetzt: 5race3-kb10gesamt	M13rev M13uni	3	Blatt-Klonkultur	5'-Ende

Tabelle 35: Identifizierte CAO-homologe Sequenzen der Genfamilie 1 (cDNA1 – SVAO1), Genfamilie 2 (cDNA2 – SVAO2) und Genfamilie 3 (cDNA3 – SVAO3) aus *S. vernalis*. (Sequenzierprimer siehe Tabelle 8).

3.4. Identifizierung und Isolierung von CAO-codierender cDNAs aus *E. cannabinum*

Neben der Identifizierung von CAO-codierenden cDNA-Sequenzen aus *S. vernalis* (siehe 3.3) wurde versucht, CAO-codierende Sequenzen aus *E. cannabinum* zu identifizieren. Dabei wurde eine Wurzelorganklonkultur von *E. cannabinum* verwendet (siehe 2.7.3).

3.4.1. PCR mit degenerierten Primern

Um einen Mittelteil einer kupferhaltigen Aminoxydase aus *E. cannabinum* zu identifizieren, wurden die beiden degenerierten Primer SD2-DAO-deg3-FOR und SD2-DAO-deg5-REV (siehe Tabelle 25 aus Kapitel 3.3.1), die schon bei *S. vernalis* zum Erfolg geführt haben, verwendet.

Nachdem aus drei Tage alten Wurzelorganklonkulturen von *E. cannabinum* Gesamt-RNA isoliert worden war (siehe 2.10.1), wurde diese durch eine RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3.1). Diese cDNA war die Matrize für eine PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.1).

95°C	3 min	} 20 x -0,5°C/Zyklus
95°C	45 sec	
56°C	1 min	
72°C	2 min	
95°C	45 sec	} 20 x
46°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Es wurde ein etwa 970 bp großes PCR-Produkt erhalten, das in den PCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert wurde (siehe 2.10.6). Nach Restriktionsanalyse und Sequenzierung (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2) wurde die erhaltene Nukleinsäuresequenz durch BLAST-Analyse (siehe 2.10.14) als eine CAO-homologe Teilsequenz identifiziert (**klon5gesamt**). Damit war das interne Fragment der **Genfamilie 1** (cDNA1) aus *E. cannabinum* vorhanden.

3.4.2. 3'RACE PCR – Genfamilie 1 und 2

Um das fehlende 3'-Ende der Sequenz der Genfamilie 1 (siehe 3.4.1) aus *E. cannabinum* zu identifizieren, wurde ein genspezifischer Primer (siehe 2.9.2.2) an Hand des internen Fragments (klon5gesamt) entworfen (siehe 3.4.1).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD8-3race1forECD	5'-CCA GAT TTG GGT GAC TCC ACG TAA TA-3'
	3'RACE cDNA1 und cDNA2
	T _m : 63,2°C

Tabelle 36: Genspezifische Primer 1 für 3'RACE der CAO-homologen Sequenz aus *E. cannabinum*.

Mit dem Oligo-dT-Primer und dem genspezifischen Primer SD8-3race1forECD (siehe Tabelle 6 und Tabelle 36) sowie cDNA als Matrize, die aus Wurzelorganklonkultur-Gesamt-RNA hergestellt worden war (siehe 2.10.2.1 und 2.10.3.1), erfolgte eine PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.1).

95°C	3 min	} 35 x
95°C	45 sec	
57°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Nach Klonierung (siehe 2.10.6) des ca. 430-480 bp großen PCR-Produktes wurde eine Restriktionsanalyse mit isolierten Plasmiden durchgeführt (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2) und drei Plasmide sequenziert (**3race1-w3**, **3race1-w5** und **3race1-w8**). Nach Sequenzvergleich stellte sich heraus, dass die beiden Sequenzen 3race1-w5 und 3race1-w8 zu 100% identisch (Nukleinsäureebene) sind. Sie gehören wie der Mittelteil zur **Genfamilie 1** aus *E. cannabinum*. Beide Sequenzen zeigten auf Nukleinsäureebene eine 100% Identität im Bereich der überlappenden Sequenzen mit dem internen Fragment (klon5gesamt, siehe 3.4.1) der Genfamilie 1. Die Sequenz 3race1-w3 gehört zu einer neuen **Genfamilie 2**, da sie nur zu 80% (Nukleinsäureebene) zur Genfamilie 1 identisch ist. Auch bei *E. cannabinum* wurden mit einem genspezifischen 3'RACE-Primer wie bei *S. vernalis* 3'-Enden aus mehreren Genfamilien identifiziert (siehe 3.3.2). Die Suche nach der Sequenz des internen Fragments und des 5'Endes der Genfamilie 2 (cDNA2) wurde nicht weiter verfolgt, weil der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Pflanze *S. vernalis* lag, so dass hier noch weitere molekularbiologische Versuche anstehen.

3.4.3. 5'RACE-PCR – Genfamilie 1

Es wurden die genspezifischen Primer SD8-5raceECDgsp1 und SD8-5race1gsp2 an Hand der Sequenz des internen Fragments (klon5gesamt) der Genfamilie 1 entworfen (siehe 2.9.2.2; Tabelle 37 und 3.4.1), um das fehlende 5'-Ende der Genfamilie 1 (cDNA1) zu identifizieren.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD8-5raceECDgsp1	5'-CTT TGG CCT TGA TTC TCT TA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer1 T _m : 53,2°C cDNA1
SD8-5race1gsp2	5'-ATC GGG ATC GGA ATC CCT CCA ACT AA-3'
	5'RACE genspezifischer Primer2 T _m : 64,8°C cDNA1

Tabelle 37: Genspezifische Primer für 5'RACE von cDNA1 aus *E. cannabinum*.

Es wurde Gesamt-RNA aus drei Tage alten Wurzelorganklonkulturen von *E. cannabinum* isoliert (siehe 2.10.1) und mit Hilfe des SD8-5raceECDgsp1-Primers bei 55°C in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3.2). Diese cDNA wurde mit einem Poly-C-Schwanz am 5'Ende versehen (siehe 2.10.4.2) und als Template für eine PCR mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) und dem

genspezifischen Primer SD8-5race1gsp2 sowie dem Abridged-Anchor-Primer (siehe Tabelle 7) verwendet (siehe 2.10.4.4).

95°C	3 min	} 35 x
94°C	30 sec	
61°C	1 min	
68°C	10 min	
68°C	10 min	
15°C	∞	

Ein ca. 1260 bp großes Amplifikat wurde kloniert (siehe 2.10.6) und nach Restriktionsanalyse mit *EcoRI* von isolierten Plasmiden (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2) wurden zwei dieser Plasmide zum Sequenzieren ausgewählt (siehe 2.10.14). Nach der Sequenzanalyse stellte sich heraus, dass beide Sequenzen (**5ecd1-w24** und **klon15gesamt**) zur **Genfamilie 1** (cDNA1 – ECAO1) aus *E. cannabinum* gehören (99% Identität auf Nukleinsäureebene untereinander und zum internen Fragment (klon5gesamt, siehe 3.4.1) und das fehlende 5'-Ende der Sequenz der Genfamilie 1 vervollständigen.

3.4.4. Zusammenfassung der aus *E. cannabinum* identifizierten Sequenzen

Sequenzname	Sequenzierprimer	Genfamilie	Gesamt-RNA-Isolierung aus	
deg5m13rev (siehe 3.4.1) deg5m13for zusammengesetzt: klon5gesamt	M13rev/ M13uni	1	Wurzel-Klonkultur	Mittelteil
3race1-w3 (siehe 3.4.2)	M13rev	2	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
3race1-w5 (siehe 3.4.2)	M13rev	1	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
3race1-w8 (siehe 3.4.2)	M13rev	1	Wurzel-Klonkultur	3'-Ende
5ecd1-w15 (siehe 3.4.3) 5ecd1-15sabine1 zusammengesetzt: klon15gesamt	M13rev sabine1	1	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende
5ecd1-w24 (siehe 3.4.3)	M13uni	1	Wurzel-Klonkultur	5'-Ende

Tabelle 38: Identifizierte CAO-homologe Sequenzen der Genfamilie 1 (cDNA1 – ECAO1) und Genfamilie 2 (cDNA2 – ECAO2) aus *E. cannabinum* (Sequenzierprimer siehe Tabelle 8).

3.5. Eigenschaften der identifizierten CAO-homologen Sequenzen aus *S. vernalis* und *E. cannabinum*

Die vier Sequenzen aus *E. cannabinum* und *S. vernalis* (siehe 3.4 und 3.3) wurden durch Protein-BLAST-Analyse als CAO-homologe Sequenzen identifiziert (siehe 2.10.14). Um weitere Eigenschaften dieser Nukleinsäure- bzw. Proteinsequenzen zu erhalten, wurden sie über Analyse-Programme im Internet untersucht (siehe 2.10.14).

Die identifizierten Sequenzen besitzen die für eine CAO typischen Charakteristika (siehe Tabelle 39). Sie haben einen offenen Leserahmen von 2,3 bis 2,4 kb mit einer Molekülmasse von 79,7 bis 81,7 kDa für das Monomer. Nach Medda et al. [1995a] hat eine CAO-Untereinheit eine Molekülmasse von 75-95 kDa. Die Proteinsequenzen besitzen die hochkonservierten Aminosäuren Asn, Tyr, Asp/Glu des

aktiven Zentrums (siehe Kasten in Abbildung 41) von kupferhaltigen Aminoxygenasen [Janes et al., 1992; Mu et al., 1992], von denen die Aminosäure Tyrosin durch eine autokatalytische posttranslationale Modifikation in den Cofaktor TPQ umgewandelt wird [Cai und Klinman, 1994a]. Der konservierte Asparaginsäurerest (siehe ↓ in Abbildung 41), der für die basen-katalysierte Protonabstraktion vom Substrat im aktiven Zentrum während des katalytischen Mechanismus verantwortlich ist [Kumar et al., 1996; Wilmot et al., 1999], ist in allen vier Sequenzen vorhanden. Auch wurden die drei konservierten Histidinreste in der Sequenz identifiziert (siehe ↓ in Abbildung 41), die als Liganden bei der Kupfer(II)-Ion-Koordination im aktiven Zentrum eine Rolle spielen [Mu et al., 1994] (siehe 1.5). Die durch „ProtParam“ (siehe 2.10.14) berechneten pI-Werte liegen im Bereich anderer pflanzlicher Aminoxygenasen (5,0 bis 7,1 nach Medda et al. [1995a]). Alle eukaryotischen CAOs sind nach Corpillo et al. [2003] bis zu 10% w/w glykosyliert. In den hier erhaltenen Sequenzen nach „NeNOGlyc“ (www.expasy.org) sind zwei bis vier Glykosylierungsstellen vorhanden. Die vorhergesagten Signalpeptidspaltungsstellen wurden durch SignalP berechnet (siehe 2.10.14).

	SVAO1	SVAO2	SVAO3	ECAO1
Länge [bp]	2335	2302	2342	2368
[As]	778	766	780	788
ORF [bp]	2160	2124	2175	2148
[As]	720	708	726	716
5'-UTR [bp]	25	23	25	35
[AS]	8	7	8	11
3'-UTR [bp]	150	155	142	185
[AS]	50	51	47	61
Start-ATG-Position [bp]	1	1	1	1
[As]	1	1	1	1
Stopp-Codon-Position [bp]	2160	2124	2175	2148
[As]	720	708	726	716
Cofaktor TPQ aus Tyrosin [As]	450	438	456	442
Asparagin Asp (D) [As]	362	350	368	352
konservierte Histidin [As]	420	408	426	410
(Cu ²⁺ -Liganden)	507	495	513	499
	509	457	515	501
N-Glykosylationsstellen [As]	223	49	189	478
	586	170	582	577
		258		
		573		
MW [Dalton]	80762,8	79679,6	81700,2	80921,1
pI	5,3	5,8	5,9	5,6
Signalpeptidspaltungsstelle	23/24	23/24	33/34	29/30
bezogen auf As-Sequenz	S/N	S/N	A/E	A/T

Tabelle 39: Zusammenfassung der Eigenschaften der CAO-homologen Sequenzen von *S. vernalis* und *E. cannabinum* (As: Aminosäure, bp: Basepaar, ORF: offene Leserahmen, UTR: untranslatierter Bereich, pI: isoelektrischer Punkt, MW: Molekulargewicht).

In der folgenden Abbildung ist ein Alignment aus den in dieser Arbeit identifizierten CAO-homologen Aminosäuresequenzen aus *S. vernalis* und *E. cannabinum* dargestellt (siehe Abbildung 41).

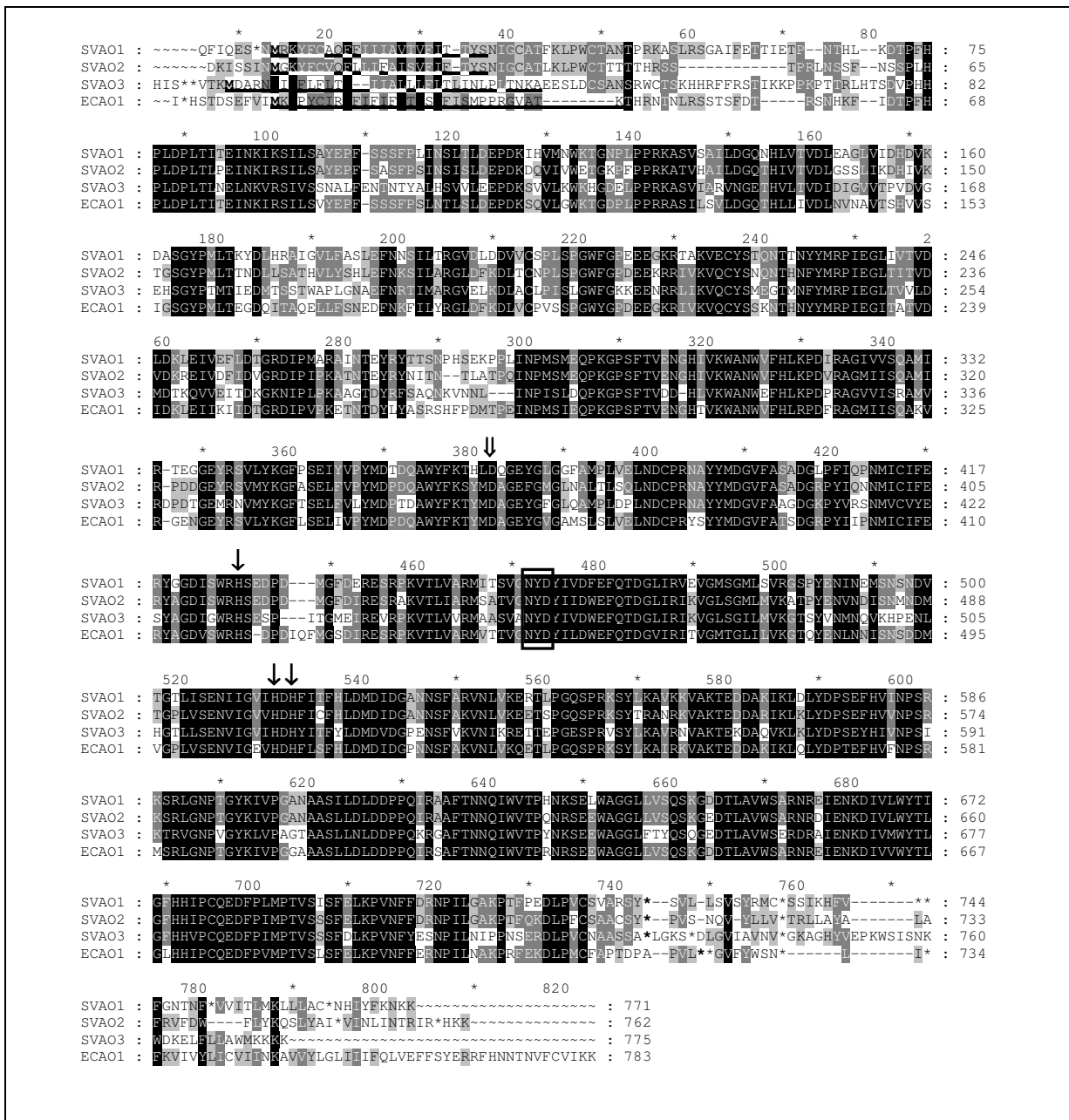


Abbildung 41: Aminosäuresequenz-Alignment von SVAO1, SVAO2, SVAO3 (*S. vernalis*) und ECAO1 (*E. cannabinum*). Das Start-Methionin ist fett gedruckt und unterstrichen, das Stoppcodon mit * und fett gedruckt dargestellt. Die konservierte Sequenz des aktiven Zentrums ist mit einem Kasten versehen. Die Signalpeptidsequenz ist unterstrichen. Drei Pfeile (↓) markieren die drei konservierten Histidinreste und ein doppelter Pfeil (⇓) markiert die konservierte Base (Asp) des aktiven Zentrums.

3.6. Gewebespezifische Expression der drei CAO-homologen Sequenzen aus *Senecio vernalis*

Nachdem die drei CAO-homologen Sequenzen (SVAO1 bis SVAO3) aus der Wurzelorgankultur bzw. dem Blatt von *S. vernalis* identifiziert worden waren (siehe 3.3), sollten durch eine Reverse-Transkription (RT-PCR) (siehe 2.10.4.5) die Transkriptionsorte dieser Sequenzen in den verschiedenen Geweben der Pflanze untersucht werden. Durch die Aufklärung der Transkriptionsorte sollte ein weiterer Hinweis auf mögliche Primärstoffwechsel- bzw. Sekundärstoffwechselenzyme

gewonnen werden. Ein Primärstoffwechselenzym ist oft in vielen oder in allen Geweben der Pflanze lokalisiert. Die Lokalisation der Transkription von Sekundärstoffwechselenzymen könnte nach dem derzeitigen Kenntnisstand auf ein oder wenige Gewebe beschränkt sein.

3.6.1. Vorversuche mit Sterilpflanzen der Klonkultur und Wildpflanzen

Zunächst wurden einige Vorversuche mit der im Institut vorhandenen *S. vernalis*-Klonkultur durchgeführt. Bei den *S. vernalis*-Sterilpflanzen war nur eine recht grobe Unterteilung in Blatt und Wurzel möglich war. Es wurde Gesamt-RNA aus der Wurzelorgankultur und dem Blatt isoliert (siehe 2.10.1). Nach Quantifizierung (siehe 2.10.2) wurden ca. 1 µg dieser Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3.1). Mit gleichen Volumina an cDNA als Matrize wurde eine PCR mit der *Pfx*-DNA-Polymerase durchgeführt (siehe 2.10.4.3). Es waren zu diesem Zeitpunkt nur Expressionsprimer für die SVAO1 mit Signalpeptidsequenz und SVAO2 mit Signalpeptidsequenz von *S. vernalis* vorhanden (siehe 3.7), so dass die SVAO3-Transkription nicht untersucht werden konnte. Zum Nachweis des Transkriptionsortes der SVAO1 (cDNA1) wurde die Primer-Kombination SD-ExpSVfor1-28gen1 mit dem SD-ExpSVrev1-28gen1-Primer (siehe Tabelle 40) und für die SVAO2 (cDNA2) die Primer-Kombination SD-ExpSVfor2-28gen2 mit dem SD-ExpSVrev2-28gen2-Primer (siehe Tabelle 40) verwendet (siehe 2.10.4.5).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-ExpSVfor1-28gen1	5'-ATA CTGCAG ATG AGG AAA TAT TTT TGT GCT CAA TTC TTC-3'
	T _m : 66,3°C SVAO1 mit Signalpeptid Forward Primer
SD-ExpSVfor1os-28mod	5'-ATA CTGCAG ATG AAC ATT GGA TGT GCC ACC TTT AAG T-3'
	T _m : 68,4°C SVAO1 ohne Signalpeptid Forward Primer
SD-ExpSVrev1-28gen1	5'-ATAT GCGGCCGC ATA AGA GCG AGC CAC GGA ACA CAC G-3'
	T _m : >75°C SVAO1 mit Signalpeptid Reverse Primer
SD-ExpSVfor2-28gen2	5'-ATA CTGCAG ATG GGA AAA TAT TTT TGT GTC CAA TTC TTA T-3'
	T _m : 65,3°C SVAO2 mit Signalpeptid Forward Primer
SD-ExpSVrev2-28gen2	5'-ATAT GCGGCCGC ATA AGA GCA AGC AGC AGA ACA AAA AGG A-3'
	T _m : 72,5°C SVAO2 mit Signalpeptid Reverse Primer

Tabelle 40: Genspezifische Primer für eine RT-PCR für die SVAO1 und SVAO2 aus *S. vernalis*.

Ein Amplifikat in der erwarteten Größe von ca. 2 kb war in den *S. vernalis*-Wurzelorganklonkulturen bei der SVAO1 und bei der SVAO2 nachweisbar. Im Blatt war in beiden Fällen kein Amplifikat vorhanden.

Da die Sterilpflanze nur grob in Blatt und Wurzel unterteilt werden konnte (siehe oben), wurden zur genaueren Differenzierung des Transkriptionsortes eine *S. vernalis*-Wild-Pflanze untersucht (siehe 2.10.4.5). Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus verschiedenen Geweben: Knospe, Blüte, junges Blatt (1. Blatt nach Blüte), altes Blatt (größer 5 cm), junger Spross (unterhalb der Blüte), alter Spross, junge Wurzel ($\varnothing < 2$ mm), alte Wurzel ($\varnothing > 4$ mm) (siehe 2.10.1). Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren. Es erfolgte eine PCR (siehe 2.10.4.1) mit der *Taq*-DNA-Polymerase mit den Primerkombinationen SD-ExpSVfor1-28gen1 mit dem SD-ExpSVrev1-28gen1 zur Amplifikation der cDNA1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1), SD-ExpSVfor1os-28mod mit dem ExpSVrev1-28gen1-Primer zur Amplifikation der cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os) sowie SD-ExpSVfor2-28gen2 mit dem SD-ExpSVrev2-28gen zur Vervielfältigung der cDNA2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2) (siehe Tabelle 40). Ein 2 kb-großes Amplifikat wurde bei der SVAO1 bei einer Annealing-Temperatur von 66°C in der Knospe und bei einer Annealing-Temperatur von 56°C in der jungen Wurzel nachgewiesen (siehe Tabelle 41). Es muss bei diesem Ergebnis beachtet werden, dass bei einer niedrigeren Annealing-Temperatur die Spezifität der Bindung der verwendeten Primer abnimmt, so dass die Knospe als möglicher Transkriptionsort wahrscheinlicher erscheint. Ein Amplifikat in der erwarteten Größe war auch nur bei der Positivkontrolle bei der höheren Annealing-Temperatur nachzuweisen. Bei der der Primerkombination SD-ExpSVfor1os-28mod und SD-ExpSVrev1-28gen1 war kein Amplifikat in der erwarteten Größe nachweisbar, d. h. es war ein „DNA-Schmier“ entstanden. Der SD-ExpSVfor1os-28mod-Primer ist nicht spezifisch, so dass er an eine Vielzahl von cDNAs gebunden hat. Bei der SVAO2 wurde das erwartete ca. 2 kb-große Amplifikat in der jungen Wurzel nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der beiden Vorversuche sind als unsicher zu bewerten.

	SVAO1 mit Signalpeptidsequenz		SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz	SVAO2 mit Signalpeptidsequenz
Transkriptions- ort	Versuch 1 Knospe Annealing-T. 66°C	Versuch 2 junge Wurzel Annealing-T. 56°C	„Schmier“ in jedem Gewebe	junge Wurzel
Positivkontrolle	+	-	+	+

Tabelle 41: Transkriptionsorte der SVAO1 (mit und ohne Signalpeptidsequenz) und SVAO2 (mit Signalpeptidsequenz) nach RT-PCR mit cDNA von Gesamt-RNA verschiedener Gewebe einer Wildpflanze (*S. vernalis*) mit den Primern aus Tabelle 40. Nach der PCR wurden 4 µl Probe auf ein 1% Agarosegel aufgetragen (Ethidiumbromidfärbung). Erwartet: 2 kb großes Amplifikat. +: Amplifikat, -: kein Amplifikat. Es wurden zwei Versuche bei zwei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen bei der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz durchgeführt. In den nicht aufgelisteten Geweben war keine Transkription nachweisbar. Positiv-Kontrolle: Plasmid mit SVAO1-Insert bzw. Plasmid mit SVAO2-Insert.

3.6.2. Lokalisation der Transkription bei Wildpflanzen

Da die verwendeten Expressionsprimer bei der Sterilpflanze und bei der Wildpflanze unterschiedliche und nicht eindeutige Ergebnisse zeigten (siehe 3.6.1), wurden durch ein Alignment bestehend aus den drei SVAO-Nukleinsäuresequenzen neue genspezifische Forward- und Reverse-Primer für die

SVAO1, SVAO2 und SVAO3 aus *S. vernalis* entworfen (siehe 2.9.2.2). Diese sollten spezifisch an nur eine Sequenz binden, d. h. möglichst viele „Missmatches“ zu den anderen Sequenzen aufweisen (siehe Tabelle 42) und einen Sequenzbereich von ca. 600 bis 1000 bp amplifizieren. Bei der SVAO1 und SVAO2 wurden die Reverse-Primer aus Tabelle 40 verwendet.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-3racefor1_rt	5'-TGA CCA CTT CAT TAC ATT TCA CTT GGA T-3'
	T _m : 60,7°C SVAO1 forward
SD-3racefor2_rt	5'-TGG GGT TGA ACG CTC TAA CTC TTT CA-3'
	T _m : 63,2°C SVAO2 forward
SD-3racefor3_rt	5'-GTG TTT GCGGCT GGT GAC GGA AAG-3'
	T _m : 66,1°C SVAO3 forward
SD-expSV-gen3kbrev	5'-AGC AGA AGA AGC GGC ATT ACA AAC AG-3'
	T _m : 63,2°C SVAO3 reverse

Tabelle 42: RT-PCR-Primer für SVAO1, SVAO2 und SVAO3 aus *S. vernalis*.

Mit den Primer-Kombinationen SD-3racefor1_rt mit SD-ExpSVrev1-28gen1 für die SVAO1, SD-3racefor2_rt mit ExpSVrev1-28gen1 für die SVAO2 sowie SD-3racefor3_rt mit der SD-expSV-gen3kbrev für die SVAO3 erfolgte jeweils eine PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.1). Als Template diente cDNA der Wildpflanze (siehe 3.6.1). Anschließend wurde wie unter 2.10.4.5 beschrieben verfahren.

95°C	5 min	} 35 x
95°C	45 sec	
56°C	1 min	
72°C	10 min	
72°C	15 min	
15°C	∞	

In der Knospe war die Transkription der SVAO1 am stärksten. Sie war aber auch in allen anderen Geweben nachweisbar (siehe Abbildung 42 A). Die SVAO2-Transkription war am stärksten in den jüngeren und sich entwickelnden Geweben (siehe Abbildung 42 B). Bei beiden waren keine gewebespezifischen Unterschiede nachweisbar. Die Transkription der SVAO3 war in der Knospe und in den älteren Pflanzenteilen nachweisbar. Ausnahmen waren hier die junge Wurzeln (siehe Abbildung 42 C). Die drei gefundenen cDNAs von *S. vernalis* scheinen Primärstoffwechselenzyme zu sein, da sie in den meisten Geweben nachweisbar waren. Aber genauere Aussagen zur Unterscheidung von Primärstoffwechselenzymen von Sekundärstoffwechselenzymen sind erst nach einem Aktivitätstest möglich.

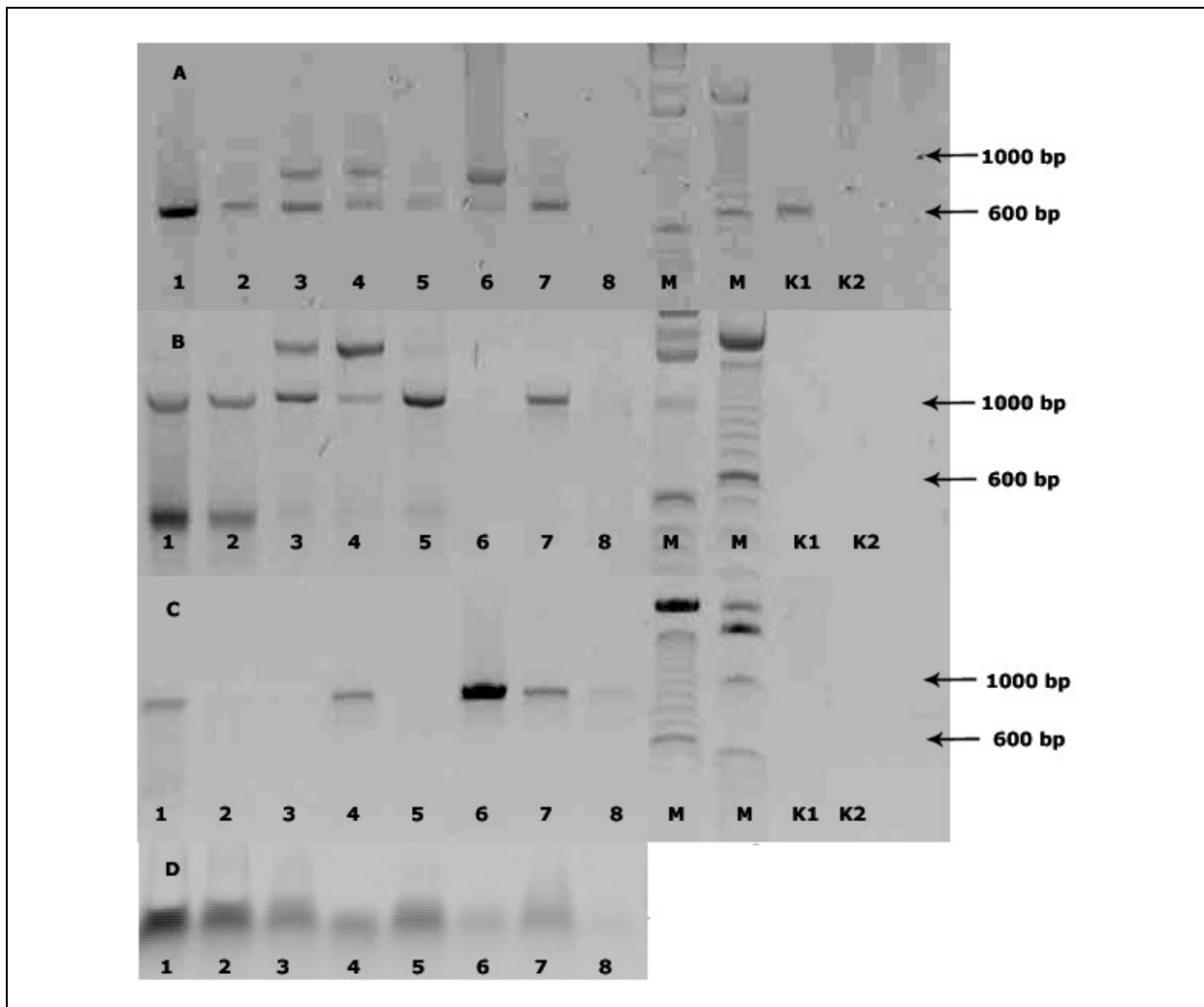


Abbildung 42: RT-PCR von verschiedenen Geweben aus einer *S. vernalis*-Wildpflanze mit cDNA von Gesamt-RNA. Es wurden gleiche Mengen an PCR-Produkt (4 μ l) auf ein 1% Agarosegel nach Ablauf der gesamten PCR aufgetragen (Ethidiumbromidfärbung).

A) mit der Primerkombination SD-3racefor1_rt mit SD-ExpSVrev1-28gen1 für SVAO1, erwartet: 660 bp Amplifikat.

B) mit der Primerkombination SD-3racefor2_rt mit SD-ExpSVrev2-28gen2 für SVAO2, erwartet: 1060 bp Amplifikat.

C) mit der Primerkombination SD-3racefor3_rt mit SD-expSV-gen3kbrev für SVAO3, erwartet: 990 bp Amplifikat.

D) RNA-Agarosegelcheck (Es wurden gleiche Mengen an Gesamt-RNA (1 μ l) auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.10.5), um das Mengenverhältnis, die Degradation und die Reinheit der isolierten RNA optisch zu überprüfen).

1. Knospe **2.** Blüte **3.** junges Blatt **4.** altes Blatt **5.** junger Spross **6.** alter Spross **7.** junge Wurzel **8.** alte Wurzel **M.** 1 kb-Marker und 100 bp-Marker **K1.** Positivkontrolle: Plasmid mit SVAO1-Insert **K2.** Positivkontrolle: Plasmid mit SVAO2-Insert. Die Positivkontrolle für SVAO3 fehlt, da ein Full-Length-Insert nicht vorhanden war und die Klonierung dieser cDNA noch aussteht.

Interessant waren hier die auftretenden Doppelbanden bei der SVAO1 und SVAO2, die eine weitere genauere Untersuchung erfordern. Eventuell war die eingesetzte Gesamt-RNA durch genomische DNA verunreinigt. Auch hat die Positivkontrolle der SVAO2 kein Amplifikat ergeben und es fehlte eine Positivkontrolle für die SVAO3, so dass auch diese Ergebnisse näher untersucht werden sollten. Desweiteren sollte eine andere Annealing-Temperatur bei der PCR getestet werden, um die Spezifität der Bindung der verwendeten Primer zu erhöhen.

Die RNA-Isolation aus der älteren Wurzel bereitete Schwierigkeiten, da sie sehr stark lignifiziert war und die Zerkleinerung schwer fiel. Obwohl nach Quantifizierung genau ein Mikrogramm Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben wurde, zeigte sich bei dem Agarose-Gelcheck eine leichte Degradation der Gesamt-RNA, so dass die durchgeführten RT-PCRs möglicherweise nicht eindeutige Ergebnisse lieferten.

3.7. Expression von CAO-homologen cDNAs aus *Senecio vernalis*

Die Identifizierung und Unterscheidung von Primärstoffwechsel- und Sekundärstoffwechsel-CAO-codierender Sequenzen erfolgte durch heterologe Expression der SVAO1 und SVAO2 mit und ohne Signalpeptidsequenz (cDNA1 und cDNA2 aus *S. vernalis*) in *E. coli* und in *P. pastoris*. Auf diese Weise wurde auch Protein in größerer Menge für einen Aktivitätstest gewonnen.

Die hier durchgeführten Expressionsversuche erfolgten nur mit diesen beiden Sequenzen. Die gesammelten Erkenntnisse sollten anschließend auf die SVAO3- bzw. ECAO1-Expression (cDNA3 aus *S. vernalis* und cDNA1 aus *E. cannabinum*) übertragen werden. Die Expression der identifizierten SVAO1- und SVAO2-Sequenzen erfolgte durch das *E. coli*-T7-Expressionssystem [Studier und Moffatt, 1986] (siehe 2.12.10). Da der Einfluss der identifizierten Signalpeptidsequenzen (siehe 3.5) der beiden SVAO-Sequenzen von *S. vernalis* auf die heterologe Expression und die Aktivität nicht bekannt war, wurde der offene Leserahmen der Sequenz mit und ohne Signalpeptidsequenz in einen pET-Expressionsvektor kloniert.

3.7.1. Heterologe Expression in *E. coli* mit pET28amod-Vektor

3.7.1.1. pET28mod-Vektor – „Site-Directed Mutagenesis“

Beim Vergleich der Restriktionskarten (siehe 2.10.14.2) der SVAO1- und der SVAO2-Sequenz aus *S. vernalis* mit den Restriktionsschnittstellen in der Multicloning Site (MSC) der im Institut vorhandenen Expressionsvektoren zeigte sich, dass keiner der pET-Vektoren für eine Expression geeignet war. Die Restriktionsenzyme der MCS der Vektoren schnitten die zu klonierende SVAO-Sequenz. Um einen Vektor für eine Klonierung verwenden zu können, musste eine „Site-Directed Mutagenesis“ durchgeführt werden. Es wurde der pET-28a-Vektor ausgewählt (siehe Tabelle 5), da hier nur eine *NcoI*-Schnittstelle in eine *PstI*-Schnittstelle umgewandelt werden konnte und dieser Vektor dann für beide SVAO-Sequenzen zur Klonierung verwendbar war. *NcoI* schnitt in den zu exprimierenden Sequenzen.

Für den Austausch der Restriktionsschnittstelle wurden die Primer SD-for-PstIpET28amod und SD-rev-PstIpET28amod entworfen (siehe Tabelle 43) und eine „Site-Directed Mutagenesis“ durchgeführt (siehe 2.10.15.1). Der neue Vektor heißt pET28amod (siehe Tabelle 5).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-for-PstIpET28amod	5'-CTT TAA GAA GGA GAT ATA <u>CTGCAG</u> GCA GCC ATC ATC-3' T _m : 72,4°C
SD-rev-PstIpET28amod	5'-GAT GAT GAT GGC TGC TGC <u>CTGCAG</u> TAT ATC TCC TTC TTA AAG-3' T _m : 72,4°C

Tabelle 43: Mutationsprimer zum Austausch der *NcoI*-Schnittstelle gegen eine *PstI*-Schnittstelle im pET-28a-Vektor durch „Site-Directed Mutagenesis“. Die neue *PstI*-Schnittstelle ist unterstrichen.

3.7.1.2. Heterologe Expression der SVAO1 aus *S. vernalis* mit und ohne Signalpeptidsequenz

Bei der Expression der PSAO mit Signalpeptidsequenz (CAO aus *Pisum sativum*) nach Koyanagi et al. [2000] wurde kein lösliches Protein erzeugt. Auch war der Einfluss der SVAO-Signalpeptidsequenz auf die Expression in *E. coli* nicht bekannt. Deshalb erfolgte die Klonierung des offenen Leserahmens der SVAO1-Sequenz (cDNA1 aus *S. vernalis*, siehe 3.3) mit und ohne Signalpeptidsequenz in den pET28amod-Vektor (siehe Tabelle 5). Die durch SignalP (siehe 2.10.14.2) berechnete Signalpeptidspaltungsstelle liegt zwischen der 23. und 24. Aminosäure (TYS/NI) in der SVAO1-Sequenz (siehe Tabelle 39). Auf Basis der SVAO1-Sequenz wurden genspezifische Primer entworfen (siehe 2.9.2.2). Die genspezifischen Forward-Primer enthielten eine *PstI*-Schnittstelle vor dem Start-ATG und der genspezifischen Reverse-Primer eine *NotI*-Schnittstelle (siehe Tabelle 44).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-ExpSVfor1-28gen1	5'-ATA <u>CTGCAG</u> ATG AGG AAA TAT TTT TGT GCT CAA TTC TTC-3'
	Expressionsprimer forward T _m : 66,3°C <i>PstI</i> -Schnittstelle
SD-ExpSVfor1os-28mod	5'-ATA <u>CTGCAG</u> ATG AAC ATT GGA TGT GCC ACC TTT AAG T-3'
	Expressionsprimer forward T _m : 68,4°C <i>PstI</i> -Schnittstelle
SD-ExpSVrev1-28gen1	5'-ATAT <u>GCGGCCGC</u> ATA AGA GCG AGC CAC GGA ACA CAC G-3'
	Expressionsprimer reverse T _m : >75°C <i>NotI</i> -Schnittstelle

Tabelle 44: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO1 mit und ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1 und SVAO1os - cDNA1 aus *S. vernalis*). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, das Start-ATG dick gedruckt und das Stoppcodon wird durch den pET28amod-Vektor definiert.

Es wurde Gesamt-RNA aus drei Tage alten Wurzelorganklonkulturen von *S. vernalis* isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3.1). Eine PCR erfolgte mit 1,5 µl (mit Signalpeptidsequenz) und 2 µl (ohne Signalpeptidsequenz) cDNA als Template, den Expressionsprimern und mit der *Pfx*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.3).

Ergebnisse

	95°C	5 min	} 35 x
	95°C	45 sec	
Annealing-Temperatur/-Zeit			
mit Signalpeptidsequenz	66°C	1 min	
ohne Signalpeptidsequenz	68°C	1 min	
Elongationstemperatur/-Zeit			
mit Signalpeptidsequenz	72°C	2 min	
ohne Signalpeptidsequenz	72°C	3 min	
	72°C	10 min	
	15°C	∞	

Die gereinigten ca. 2 kb-großen PCR-Produkte (siehe 2.10.9.1) und der pET28mod-Vektor wurden mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten (siehe 2.10.7). Nach Enzyminaktivierung wurden Restriktionen mit *PstI* durchgeführt, die Restriktionsprodukte aufgereinigt (siehe 2.10.9.1) und nach Mengenabschätzung durch ein Agarosegel die beiden Amplifikat und der Expressionsvektor pET28amod ligiert (siehe 2.10.8). Nach mehreren erfolglosen Versuchen die Ligationsprodukte in *E. coli* DH5 α -Zellen zu transformieren (d. h. die Plasmide enthielten nach PCR-Screening mit den Expressionsprimern kein Insert (siehe 2.10.12.3) oder es wurden keine Klone erhalten), wurden *E. coli* TOP10-Zellen verwendet (siehe Tabelle 2). Der veränderte pET28amod-Vektor ließ sich nur in *E. coli* TOP10-Zellen erfolgreich transformieren. Die erhaltenen transformierten Zellen wurden auf das Vorhandensein der Plasmide überprüft (siehe 2.10.9.4 und 2.10.12.2).

Zur Überexpression wurden isolierte und kontrollsequenzierte Plasmide in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert (siehe 2.10.11). Die Expression erfolgte in LB-flüssig-Medium bei 25°C und 37°C (siehe 2.4 und 2.12.10.1). Die Expression wurde durch SDS-PAGE-Gele überprüft (siehe 2.12.1). Es wurde jeweils das exprimierte SVAO1-Protein (mit und ohne Signalpeptidsequenz) nur im Zellpellet in Form von Inclusion-bodies (IBs) nachgewiesen.

Um lösliches rekombinantes Protein durch optimierte Induktionsbedingungen zu erhalten, wurde die IPTG-Konzentration bei der Induktion variiert (siehe Tabelle 45 und Tabelle 46). Bei der heterologen Expression der SVAO1 und der SVAO1os wurde kein lösliches rekombinantes Protein trotz Variation der Induktionstemperatur oder der IPTG-Konzentration erhalten. Die rekombinanten Proteine der SVAO1 und der SVAO1os befanden immer als Inclusion-bodies (IBs) in der Bakterienzelle.

Temperatur	IPTG					Ort der SVAO1-Expression
	0,01 mM	0,05 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM	
25°C	+	+	+	+	+	→ Pellet (IBs)
37°C	+	+	+	+	+	→ Pellet (IBs)

Tabelle 45: Variation der IPTG-Konzentration bei der Induktion der SVAO1 (cDNA1 mit Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) bei 25°C und 37°C für 4 h. Das Zellpellet und der Überstandes wurden nach Zellaufschluss durch Ultraschall (siehe 2.12.8) auf Expression durch SDS-PAGE untersucht.

+: Expressionsbande in 10% SDS-PAGE-Gelen (ca. 80 kDa) nach Coomassie-Färbung. Das heterolog exprimierte Protein befand sich immer im Pellet als Inclusion-bodies (IBs) und nicht im Überstand. Es gab keinen Unterschied in der Expressionsstärke zwischen 25°C oder 37°C.

Temperatur	IPTG					Ort der SVAO1os-Expression
	0,01 mM	0,05 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM	
25°C	-	+	+	+	+	→ Pellet (IBs)
37°C	+	+	+	+	+	→ Pellet (IBs)

Tabelle 46: Variation der IPTG-Konzentration bei den Induktionen der SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz von *S. vernalis*) bei 25°C und 37°C für 4 h. Das Zellpellet und der Überstandes wurden nach Zellaufschluss durch Ultraschall (siehe 2.12.8) auf Expression durch SDS-PAGE untersucht.

-: keine Expressionsbande und +: Expressionsbande in 10% SDS-PAGE-Gelen (ca. 80 kDa) nach Coomassie-Färbung. Das heterolog exprimierte Protein war immer im Pellet als Inclusion-bodies (IBs) und nicht im Überstand vorhanden. Die Expression war bei 37°C stärker als bei 25°C (dick gedrucktes +).

Um lösliches heterolog exprimiertes Protein im Überstand zu erhalten, wurde bei einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM bei 37°C der pH-Wert des LB-Mediums bei der Expression von 7,5 bis 8,5 verändert. Auch hier befand sich nach vier Stunden Induktion das Protein im Pellet als IBs. Der getestete pH-Wert hatte somit keinen Einfluss auf die IB-Bildung.

3.7.1.3. Heterologe Expression der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2) aus *S. vernalis*

Zur Klonierung des offenen Leser Rahmens der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2, cDNA2 aus *S. vernalis*) (siehe 3.3) in den pET28amod-Vektor (siehe Tabelle 5) wurden genspezifische Primer entworfen (siehe Tabelle 47). Der Forward-Primer besaß eine *Pst*I-Schnittstelle vor dem Start-ATG und der Reverse-Primer eine *Not*I-Schnittstelle.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-ExpSVfor2-28gen2	5'-ATA <u>CTGCAG</u> ATG GGA AAA TAT TTT TGT GTC CAA TTC TTA T-3'
	Expressionsprimer forward T _m : 65,3°C
	<i>Pst</i> I-Schnittstelle
SD-ExpSVrev2-28gen2	5'-ATAT <u>GCGGCCGC</u> ATA AGA GCA AGC AGC AGA ACA AAA AGG A-3'
	Expressionsprimer reverse T _m : 72,5°C
	<i>Not</i> I-Schnittstelle

Tabelle 47: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2 - cDNA2 aus *S. vernalis*). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, das Start-ATG dick gedruckt und das Stoppcodon wird durch den pET28amod-Vektor definiert.

Nach Umschreiben von Gesamt-RNA in cDNA (siehe 2.10.3.1), die aus drei Tage alten Wurzelorganklonkulturen von *S. vernalis* isoliert worden war, wurden 2 µl cDNA als Matrize für eine PCR unter Verwendung der *Pfx*-DNA-Polymerase und den genspezifischen Primern SD-ExpSVfor2-28gen2 und SD-ExpSVrev2-28gen2 eingesetzt (siehe 2.10.4.3).

95°C	5 min	20 x -0,5°C/Zyklus
95°C	45 sec	
50°C	1 min	
72°C	3 min	
95°C	45 sec	20 x
40°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Die Klonierung und Expression der SVAO2 erfolgte wie unter 3.7.1.2 beschrieben. Um auch bei der SVAO2 die optimalen Induktionsbedingungen zu testen und zur Inclusion-bodies-Vermeidung, wurden bei der SVAO2 die Induktionstemperatur, die IPTG-Konzentration und die Induktionszeit variiert.

Temperatur/Induktionszeit		IPTG					Ort der SVAO2-Expression
		0,01 mM	0,05 mM	0,2 mM	0,5 mM	1,0 mM	
16°C	4 h	x	x	x	-	-	→ Pellet (IBs)
	o/n	x	x	x	+	+	
25°C	4 h	+	+	+	+	+	→ Pellet (IBs)
	o/n	+	+	+	+	+	→ Pellet (IBs)
37°C	4 h	-	-	-	-	-	
	o/n	-	-	-	-	-	

Tabelle 48: Variation der IPTG-Konzentration bei Induktionen der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2 - cDNA2 aus *S. vernalis*) bei 16°C, 25°C und 37°C für 4 Stunden und über Nacht (o/n). Das Zellpellet und der Überstandes wurden nach Zellaufschluss durch Ultraschall (siehe 2.12.8) auf Expression durch SDS-PAGE untersucht.

-: keine Expressionsbande, x: nicht gemessen, +: sehr schwache Expressionsbande in 10% SDS-PAGE-Gelen nach Coomassie-Färbung (erwartet: ca. 80 kDa). Die Expression zeigte sich nach Zellaufschluss durch Ultraschall in drei untersuchten Proben im Pellet als Inclusion-bodies (IBs) und nicht im Überstand (siehe 2.12.8). Die Intensität der Expressionsbande änderte sich durch Variation der Temperatur nicht.

Trotz Variation der IPTG-Konzentration, der Inkubationstemperatur und -zeit wurde das heterolog exprimierte SVAO2-Protein nur als IBs in den Bakterien nachgewiesen (siehe Tabelle 48). Eine SVAO2-Expression war in SDS-PAGE-Gelen nur bei 25°C und 16°C als sehr schwache Bande detektierbar. Erst die direkte Analyse des Pellets nach Zellaufschluss zeigte eine Expressionsbande (siehe Abbildung 45). Bei 16°C konnte die Expressionsbande im SDS-Gel nicht reproduzierbar und unabhängig von der IPTG-Konzentration nachgewiesen werden.

3.7.2. Coexpression mit Chaperonen

Chaperone gehören zum Reparatursystem einer Zelle für mißgefaltete oder für aggregierte Proteine. Stressbedingungen, wie z. B. Hitzeschock, induzieren die Synthese von Chaperonen in einer Zelle [Mogk et al., 2001]. Zwei bekannte und gut untersuchte Familien sind die Hsp70 (DnaK) und Hsp60 (GroEL) (Hsp: Hitzeschockproteine), die hydrophobe Oberflächen von falsch gefalteten Proteinen erkennen und diese in die aktive Konformation bringen [Bukau und Horwich, 1998]. Bei einer Chaperon-Coexpression konnten einige heterolog exprimierte Enzyme, die sonst als Inclusion-bodies

(IBs) in der *E. coli*-Zelle abgelagert wurden, in eine lösliche aktive Form überführt werden [Vonnheim et al., 1999; Schauer et al., 2002].

3.7.2.1. Umklonierung der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os) zum Austausch der Resistenzkassette

Bei der heterologen Expression der SVAO1 ohne Signalsequenz (SVAO1os - cDNA1 aus *S. vernalis*) waren die exprimierten Proteine als unlösliche Aggregate (Inclusion-bodies – IBs) in den *E. coli*-Zellen abgelagert worden (siehe 3.7.1.2 und 3.7.1.3). Zur Vermeidung von IBs gibt es eine Vielzahl von Strategien. Eine davon ist die Coexpression mit Helferproteinen (Chaperonen) (siehe 3.7.2). Der verwendete pET28mod-Vektor besitzt eine Kanamycin-Resistenz (siehe Tabelle 5). Da die hier verwendeten Chaperone durch Plasmide kodiert werden, die auch eine Kanamycin-Resistenz besitzen (siehe Tabelle 5), war eine gleichzeitige Verwendung des SVAO1os-Klonierungskonstruktes (siehe 3.7.1.2) auf Grund fehlender Selektion nicht möglich. Es konnte nach der Transformation keine Unterscheidung getroffen werden, ob diese erfolgreich war oder nicht. Deshalb wurde die Resistenz-Kassette des SVAO1os-pET28mod-Vektor-Konstrukts durch eine Ampicillin-Kassette von einem anderen Vektor ausgetauscht. Bei der Wahl der Restriktionsenzyme für eine Umklonierung musste darauf geachtet werden, dass sie nur die Resistenzkassette und nicht an anderer Stelle im Vektor schnitten. Es wurde der pET21d-Vektor zur Umklonierung verwendet (siehe Tabelle 5). Der pET21d-Vektor und das SVAO1os-Konstrukt wurde in einem Doppelverdau durch die beiden Restriktionsenzyme *Dra*III (\equiv *Ade*I) und *Bst*1107I geschnitten (siehe 2.10.7). Diese beiden Enzyme schnitten jeweils die Resistenz-Kassette aus dem SVAO1os-Plasmid und dem pET21d-Vektor (siehe 2.10.7). Nach einer Agarosegelreinigung (siehe 2.10.9.1) wurde eine Ligation bei 25°C (siehe 2.10.8) mit der Ampicillin-Resistenzkassette sowie mit dem Vektor-Konstrukt durchgeführt. Das Produkt wurde in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (siehe 2.10.11) und nach Restriktionsanalyse mit *Eco*RV mit isolierten Plasmiden (siehe 2.10.9.4) konnte ein neues ampicillinresistentes Konstrukt der SVAO1os identifiziert werden.

3.7.2.2. Coexpression der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os)

Zur Vermeidung von Inclusion-bodies (IBs) bei einer heterologen Expression der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os - cDNA1 von *S. vernalis*) wurde eine Coexpression mit Chaperonen getestet. Da CAOs ein Molekulargewicht um die 80 kDa besitzen, kam nur das Chaperon DnaK mit den Co-Chaperonen DnaJ und GrpE (Plasmid pRDKJG) in Frage (siehe Tabelle 5). Die Hsp60 besitzen eine Faltungskammer, die nur für Polypeptide kleiner als 60 kDa Platz bietet.

Es wurde ein positiv getesteter Plasmid, der SVAO1os im pET21d-Vektor (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) (siehe 3.7.2.1) in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert (siehe 2.10.11), der schon den transformierten Plasmid pRDKJG enthielt. Zur Expression wurden diese in LB-flüssig-Medium (siehe 2.4) bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,4-0,8 angezogen und mit 0,5 mM IPTG zur Induktion für 4 h bei 37°C versetzt (siehe 2.12.10.1). Die SVAO1os-Expression wurde mit Hilfe von SDS-PAGE-Gelen überprüft (siehe 2.12.1). Nach Zellaufschluss

(siehe 2.12.8), His-Tag-Reinigung des Überstandes und Konzentrierung zeigte sich (siehe 2.12.9.1), dass das SVAO1os-Protein im Überstand nachweisbar war (siehe Abbildung 43 b). Vor der His-Tag-Reinigung konnte „optisch“ kein SVAO1os-Protein im Überstand nachgewiesen werden, da das stark exprimierte DnaK-Chaperon (69 kDa) ein Erkennen einer Expressionsbande verhinderte. Im Pellet war weiterhin SVAO1os-Protein erkennbar (siehe Abbildung 43 a).

Durch Coexpression mit Chaperonen konnte bei der SVAO1os lösliches rekombinates Protein erzeugt werden! Neben dem SVAO1os-Protein haben noch weitere Proteine am His-Tag gebunden, u. a. auch die drei Chaperone. Deshalb sollten bei Aktivitätstests Negativ-Kontrollen parallel mit analysiert werden, um so einen Umsatz durch die Chaperone und andere „Verunreinigung“ zu erkennen und aus zu schließen.

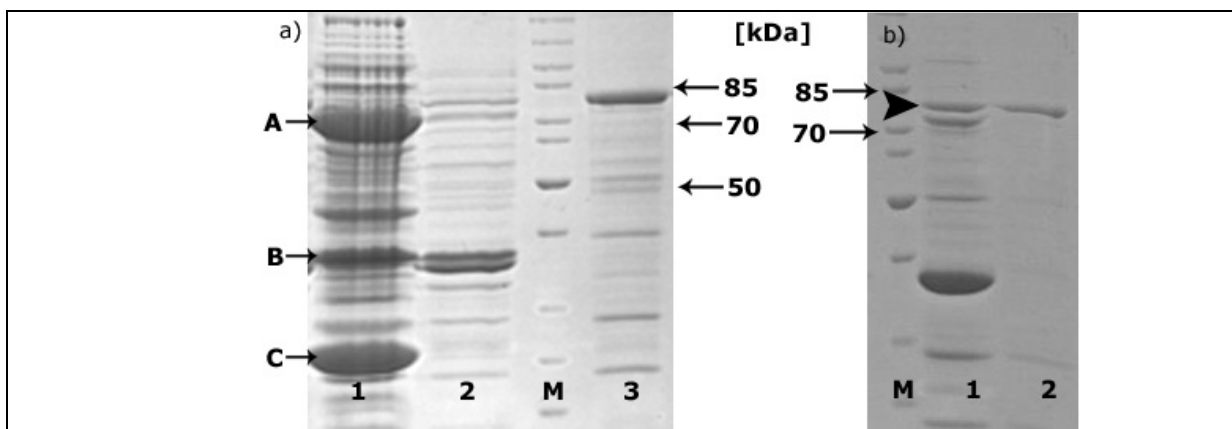


Abbildung 43: Coexpression mit Chaperonen (Plasmid pRDKJG) von SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Die Induktion erfolgte mit 0,5 mM IPTG bei 37°C für 4 Stunden und anschließend wurde eine SDS-PAGE (10% Trenngel, gefärbt mit Coomassie) durchgeführt. Erwartet: ca. 80 kDa.

a) Analyse des Überstandes und des Pellets nach Zellaufschluss mit dem Sonifier (siehe 2.12.8).

1. Überstand **2.** Pellet **3.** Referenz: solubilisierter SVAO1os-Protein (ca. 80 kDa) **M.** Protein-Marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas)

b) Native His-Tag-Reinigung (siehe 2.12.9.1) des erhaltenen Überstands aus Bahn 2 Abbildung a.

M. Protein-Marker **1.** konzentriertes His-Tag-Reinigungseluat des Überstandes **2.** Referenz: solubilisierter SVAO1os Protein (ca. 80 kDa)

Chaperone: A. DnaK 69 kDa, B. DnaJ 41 kDa, C. GrpE 24 kDa

Für Aktivitätstests (siehe 2.15.6 und 2.16.1) von rekombinant-erzeugten SVAO1os-Protein wurden Bakterien nach der Expression geerntet und das Pellet in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH-Wert 7, 2 mM DTT) aufgeschlossen (siehe 2.12.8) und umgepuffert (siehe 2.12.5). Nach His-Tag-Reinigung durch Ni-NTA-Agarose (siehe 2.12.9.1) und Konzentrierung (siehe 2.12.5.1) wurde der Extrakt mit [¹⁴C]Homospermidin, [¹⁴C]Spermidin, [¹⁴C]Spermin oder [¹⁴C]Putrescin bei 30°C für 1 bis 20 h inkubiert. Als Zusätze wurden 0,3 U/μl Catalase, 0,1 U/μl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH verwendet (siehe 3.8.2.7 - Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 mit und ohne Signalpeptidsequenz nach Expression in *E. coli*-Zellen und der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz). Die durchgeführten Inkubationsversuche zeigten keine Aktivität mit den Substraten Homospermidin und Putrescin. Ein Umsatz war bei den Polyaminen Spermidin und Spermin zu beobachten. Aber

Kontrollversuche von exprimierten Chaperonproteinrohextrakten mit Spermidin und Spermin ohne exprimiertes SVAO1-Protein ergaben, dass dieser Umsatz durch die Chaperone entstanden war (siehe 3.8.2.2). Da kein Umsatz durch das SVAO1os-Protein zu messen war, wurden einige Parameter bei den Inkubationen verändert. Trotz FAD-Zusatz, Cu(II)-Ionen-Zusatz, erhöhten Catalaseeinsatz als auch eine Sauerstoffzufuhr (offener Gefäßdeckel und alle 15 min kräftig mit geschlossenem Deckel schütteln) während der Inkubation war kein Umsatz messbar (siehe 2.16.1). Diese Radio-Dünnschichtchromatographie-Messungen wurden mit der HPLC nach Benzoylierung über Radio- und UV-Detektion bestätigt (siehe 2.16.2). Der fehlende Umsatz könnte an mehreren Faktoren liegen, wie z. B. nicht optimale Inkubationsbedingungen, „falsche“ Substrate, zu wenig aktives SVAO1os-Protein, keine vollständige TPQ-Bildung sowie fehlender Sauerstoff.

3.7.2.3. Coexpression der SVAO2 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO2os)

Bei der heterologen Expression der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2 - cDNA2 aus *S. vernalis*) war nur eine sehr schwache Expressionsbande im SDS-PAGE-Gel nachweisbar (siehe 3.7.1.3) und es wurden Inclusion-bodies (IBs) gebildet. Auch waren schon einige Erfolge bei der Coexpression mit Chaperonen bei der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os - cDNA1 von *S. vernalis*) in Bezug auf die Löslichkeit zu verzeichnen (siehe 3.7.2.1). Deshalb wurde für eine Coexpression der offene Leserahmen der SVAO2 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO2os - cDNA2 aus *S. vernalis*) in den pET23a-Vektor (siehe Tabelle 5), der eine Ampicillin-Resistenz und einen His-Tag besaß, kloniert. Dafür wurde ein neuer genspezifischer Forward-Expressionsprimer für die SVAO2os entworfen. Die durch SignalP (siehe 2.10.14.2 und Tabelle 39) berechnete Spaltungsstelle der SVAO2-Signalpeptidsequenz liegt bei Aminosäure 23/24 (TYS/NI). Der neue Forward-Primer besitzt eine *NdeI*-Schnittstelle und das Start-ATG wird durch die Schnittstelle definiert. Der Reverse-Primer wurde nicht verändert (siehe Tabelle 49).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD10-ExpSVfor2-23os	5'-ATA TAA <u>CATATG</u> AAC ATT GGT GC GCC ACC CTT AA-3'
	Expressionsprimer forward T_m: 66,0°C <i>NdeI</i> -Schnittstelle
SD-ExpSVrev2-28gen2	5'-ATAT <u>GCGGCCGC</u> ATA AGA GCA AGC AGC AGA ACA AAA AGG A-3'
	Expressionsprimer reverse T_m: 72,5°C <i>NotI</i> -Schnittstelle

Tabelle 49: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO2 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO2os-cDNA2 aus *S. vernalis*). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, das Start-ATG dick gedruckt und das Stoppcodon wird durch den pET23a-Vektor definiert.

Als Template für eine PCR (siehe 2.10.4.4) mit den genspezifischen Primern SD10-ExpSVfor2-23os und SD-ExpSVrev2-28gen2 sowie mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) wurden 2 µl des 1/1000 mit Wasser verdünntes kontrollsequenziertes Plasmid (pET28amod-Vektor mit SVAO2-Insert, siehe 3.7.1.3) verwendet.

95°C	3 min	} 35 x
93°C	30 sec	
67°C	1 min	
68°C	10 min	
68°C	20 min	
15°C	∞	

Nach Aufreinigung eines ca. 2100 bp großen PCR-Produktes (siehe 2.10.9.1) wurden das DNA-Fragment und der pET23a-Vektor mit dem Restriktionsenzym *NdeI* geschnitten (siehe 2.10.7). Nach Agarosegelreinigung (siehe 2.10.9.1) wurde erst eine Restriktion mit *NotI* und nach einer erneuten Reinigung wurde eine Ligation über Nacht bei 16°C durchgeführt (siehe 2.10.8). Nach Transformation in *E. coli* TOP10-Zellen (siehe 2.10.11 und Tabelle 2) und Restriktionsanalyse wurden ein Plasmid isoliert (siehe 2.10.12.2 und 2.10.9.4). Dieser kontrollsequenzierte Plasmid wurde in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert (siehe 2.10.11). Die Expression erfolgte wie unter 3.7.1.2 beschrieben. Das Ergebnis der SVAO2os-Expression wurde durch SDS-PAGE-Gele überprüft (siehe 2.12.1). Es gab keinen Unterschied in der Intensität der Expressionsbande bei der Variation der IPTG-Konzentration (0,1 mM und 1 mM) oder der Temperatur (25°C und 37°C). Auch ein Cu(II)-Ionen-Zusatz von 12 µM zur Unterstützung der TPQ-Bildung im aktiven Zentrum (siehe 1.5) zeigte keine Veränderung. Es war wie bei der Expression der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz nur eine sehr schwache Bande von ca. 80 kDa im SDS-PAGE-Gel erkennbar (siehe 3.7.1.3) und die Proteine wurden nach Zellaufschluss (siehe 2.12.8) in der Pelletfraktion als Inclusion-bodies lokalisiert. Ob eine Coexpression mit Chaperonen lösliches SVAO2os-Protein erzeugt, muss noch untersucht werden.

3.7.3. Renaturierung der SVAO aus Inclusion-bodies (IBs)

Da trotz Variation der Expressionsbedingungen die heterolog exprimierten SVAO-Proteine als inaktive unlösliche Aggregate in der Bakterienzelle (Inclusion-bodies – IBs) nachgewiesen wurden (siehe 3.7.1.2, 3.7.1.3 und 3.7.4.1), sollten diese parallel zu den „Coexpression mit Chaperonen“-Versuchen (siehe 3.7.2) durch *in vitro*-Faltung in eine aktive Form zurückgeführt werden. Diese Rückfaltung war schon bei der menschlichen Lysyloxidase, einer kupferabhängigen Aminoxidase, erfolgreich verlaufen [Jung et al., 2003; Kim et al., 2003]. Zuerst mussten die Renaturierungsprozeduren für die SVAO aus *S. vernalis* optimiert werden.

3.7.3.1. Renaturierung der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1)

Um die optimalen Renaturierungsbedingungen der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (cDNA1 aus *S. vernalis*) zu bestimmen, wurde die SVAO1 im pET28amod-Vektor (siehe 3.7.1.2) in einem LB-Kulturvolumen von 50-200 ml (siehe 2.4) bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5-0,7 angezogen und mit 0,5 mM IPTG für vier Stunden bei 37°C induziert. Nach Ott et al. [1996] sollte durch Kombination von Lysozym mit Sonifier beim Zellaufschluss erreicht werden, das verstärkt aktives Protein und weniger Inclusion-bodies (IBs) erhalten werden. Deshalb wurden die geernteten Zellen mit Lysozym und Sonifier aufgeschlossen (siehe 2.12.8). Anschließend erfolgte die Solubilisierung der IBs über Nacht

bei 4°C mit 1X Solubilisierungspuffer (3% *N*-Lauroylsarcosin, 2 mM DTT) (siehe 2.12.11). Die SVAO1 (Pfeil) ließ sich durch Solubilisierung in Lösung bringen (siehe Abbildung 44).

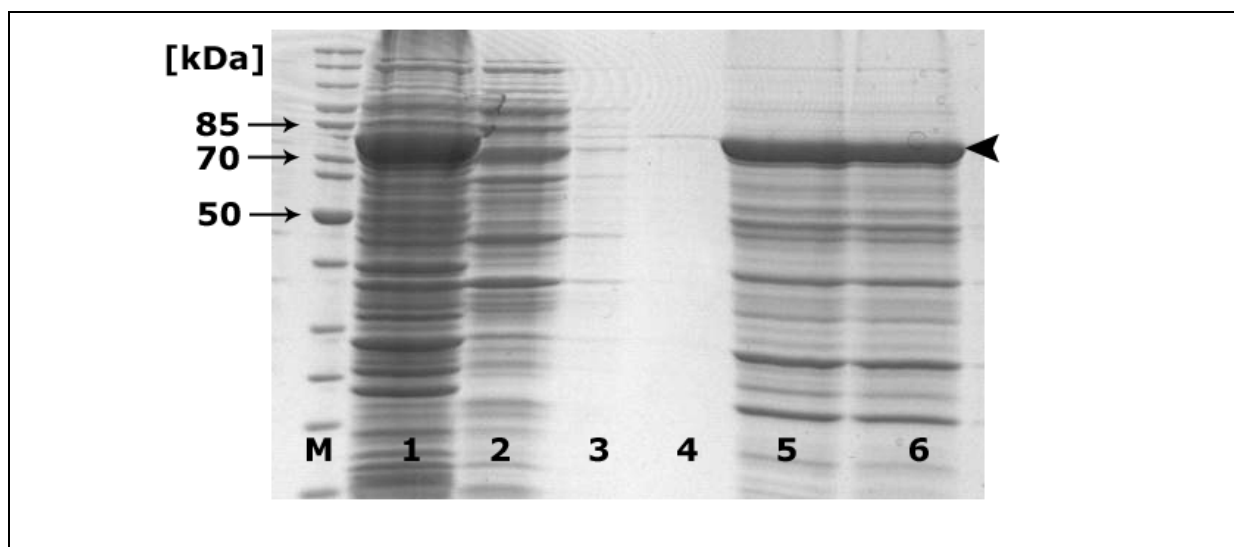


Abbildung 44: Solubilisierung von Inclusion-bodies der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1, cDNA1 aus *S. vernalis*). Die Isolierung aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen erfolgte durch Lysozym mit Ultraschallaufschluss (nach 2.12.11). Die Solubilisierung wurde mit 1x Solubilisierungspuffer (3% *N*-Lauroylsarcosin, 2 mM DTT, über Nacht bei 4°C) durchgeführt und die Solubilisierung mit einem 10% SDS-PAGE-Trenngel (nach Coomassie-Färbung) untersucht. **M.** Proteinmarker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas). **1.** Sonifizierzelllysate **2.** Überstand nach Zellaufschluss **3.** Waschlösung1 **4.** Waschlösung2 **5.** Pellet nach Zellaufschluss **6.** Solubilisierte IBs (Pfeil).

Zusätzlich wurde eine Solubilisierung der IBs nach Jung et al. [2003] getestet. Sie lieferte vergleichbare Ergebnisse wie die native Solubilisierung.

Um das solubilisierbare SVAO1-Protein von *E. coli*-Proteinen im Solubilisierungspuffer nach einer Solubilisierung abzutrennen, wurde eine denaturierende (siehe 2.12.9.2) und eine native His-Tag-Reinigung (siehe 2.12.9.1) durchgeführt. Beide lieferten vergleichbare Ergebnisse. Neben dem SVAO1-Protein wurden noch *E. coli*-Proteine an die Matrix gebunden.

Die Rückfaltung der solubilisierten SVAO1-Proteine in ihre aktive Form erfolgte durch Dialyse. Zur Optimierung der Dialysebedingungen wurde der Dialyse-Puffer variiert. Es wurde ein 20 mM TRIS-Puffer (1x Dialysepuffer) und ein 10 mM Kaliumphosphatpuffer nach Jung et al. [2003] mit verschiedenen Zusätzen nach Rudolph et al. [1997] verwendet. Es wurde 10% Glycerol zur Verbesserung der Rückfaltung und 40 µM Kupfer(II)-Ionen zur Unterstützung der TPQ-Bildung (siehe 1.5) zugesetzt. Da bei CAOs Disulfidbrücken durch Kumar et al. [1996], Wilce et al. [1997], Li et al. [1998] und Duff et al. [2006] nachgewiesen worden sind, wurde das Glutathion Redox-Paar (1 mM reduziertes und 0,2 mM oxidiertes Glutathion) zur Unterstützung von Disulfidbrückenbildung und 0,1 mM DTT zur Proteinstabilisierung hinzugefügt. Nach 2-9 Tagen Dialyse und Umpufferung auf 0,1 M Kaliumphosphatpuffer sowie anschließender Konzentrierung erfolgten Aktivitätstests (siehe 2.12.5, 2.15.6 und 2.16.1). Trotz Variation des pH-Wertes im Assay-Puffer war keine reproduzierbare Aktivität unter den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Bedingungen mit den Substraten Homospermidin, Spermidin, Spermin oder Putrescin zu messen (siehe 3.8.2.7). Der Grund hierfür

kann in einer nicht optimalen Rückfaltung der solubilisierten Proteine liegen, so dass sich auch das TPQ des aktiven Zentrums von CAOs nicht bilden konnte (siehe 1.5). Auch können die Assay-Bedingungen noch nicht vollständig optimiert worden sein.

3.7.3.2. Renaturierung der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2)

Für eine Renaturierung der entstandenen Inclusion-bodies der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2, cDNA2 aus *S. vernalis*), kloniert in den pET28amod-Vektor (siehe 3.7.1.3) und transformiert in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, wurde eine Kultur von 100-200 ml LB-Medium angezogen (siehe 2.4). Bei einer OD₆₀₀ ~0,5-0,6 erfolgte die Induktion mit 0,5 mM IPTG für 4 h bei 25°C. Die Inclusion-bodies (IBs) aus den Bakterien wurden mit verschiedenen Methoden isoliert (siehe 2.12.8 und 2.12.11). Anschließend wurde eine Solubilisierung der IBs durchgeführt (siehe 2.12.9.1)). Die SVAO2 (siehe Pfeil in Abbildung 45) ließ sich durch Solubilisierung in Lösung bringen. Neben dem SVAO2-Protein waren noch *E. coli*-Proteine in der Lösung vorhanden.

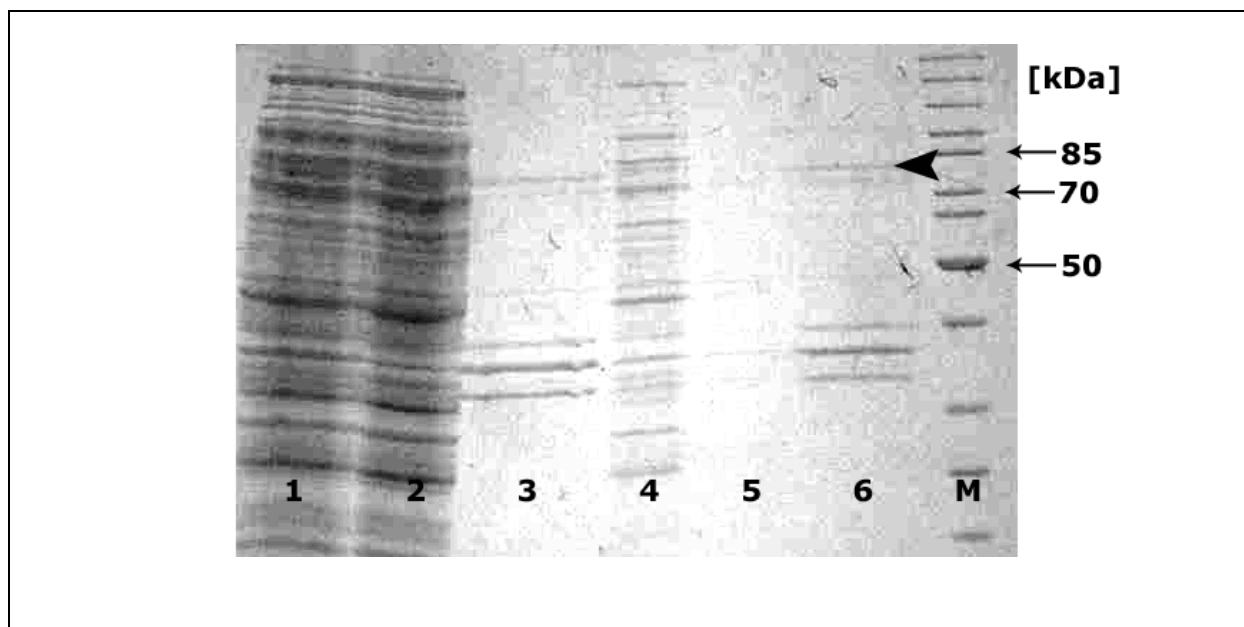


Abbildung 45: Solubilisierung von Inclusion-bodies der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (SVAO2, cDNA2 von *S. vernalis*). Die Isolierung aus *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen erfolgte durch Lysozym mit Ultraschallaufschluss (nach 2.12.11). Dabei wurde 1x Solubilisierungspuffer (2% *N*-Lauroylsarcosin, 1 mM DTT, über Nacht bei 4°C) verwendet und die Solubilisierung mit einem 10% SDS-PAGE-Trenngel nach Coomassie-Färbung untersucht. **1.** Sonifizierzelllysate **2.** Überstand nach Zellaufschluss **3.** Pellet nach Zellaufschluss **4.** Waschlösung1 **5.** Waschlösung2 **6.** Solubilierte IBs (sehr schwache Bande - Pfeil) **M.** Proteinmarker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas).

Eine Abtrennung und Reinigung der solubilisierten SVAO2-Inclusion-bodies von *E. coli*-Proteinen erfolgte über eine native His-Tag-Reinigung (siehe 2.12.9.1). Die Analyse der Reinigung erfolgte über SDS-PAGE (siehe 2.12.1). Bei den solubilierten IBs war eine Proteinbande in der Größe von etwa 80 kDa nach His-Tag-Reinigung nachweisbar. Mit dem konzentrierten His-Tag-Eluat wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Es war kein Umsatz nachweisbar (siehe 2.15.1, 2.15.6 und 3.8.2). Die Rückfaltung der SVAO2 nach Solubilisierung mit oder ohne His-Tag-Reinigung durch Dialyse (siehe

3.7.3 - SVAO1 mit Signalpeptidsequenz) führte zu keinem Ergebnis, da die Proteine während der Dialyse im Dialyseschlauch ausgefallen waren.

3.7.3.3. Renaturierung der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os)

Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Informationen über den Einfluss der SVAO1-Signalpeptidsequenz auf die Aktivität vorlagen, sollten parallel zur Solubilisierung der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1, cDNA1 aus *S. vernalis*) (siehe 3.7.3.1) auch die Inclusion-bodies der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os, cDNA1 aus *S. vernalis*) durch Dialyse in ihre aktive Konformation rückgefaltet werden. Die in den pET28mod-Vektor klonierte SVAO1os und der in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformierte Plasmid (siehe 3.7.1.2) wurde nach Standardbedingungen (siehe 2.12.10.1) induziert. Dabei waren 12 μ M Cu(II)-Ionen im Medium zur Unterstützung der TPQ-Bildung im aktiven Zentrum der CAO bei der Induktion enthalten (siehe 1.5). Für die Solubilisierung der IBs waren folgende Bedingungen am besten: Das Bakterienpellet wurde mit 1x Waschpuffer versetzt und mit Hilfe des Sonifiers aufgeschlossen (siehe 2.12.8). Nach Waschschritten wurden die IBs in Solubilisierungspuffer (10 mg Pellet/ml), der 2% *N*-Lauroylsarcosin und 1 mM DTT enthielt, unter Kühlung in meist drei Stunden vollständig gelöst (siehe 2.12.11). Die Solubilisierung wurde mit SDS-PAGE überprüft (siehe 2.12.1). Das SVAO1os-Protein ließ sich durch Solubilisierung in Lösung bringen (siehe Abbildung 46, Pfeil).

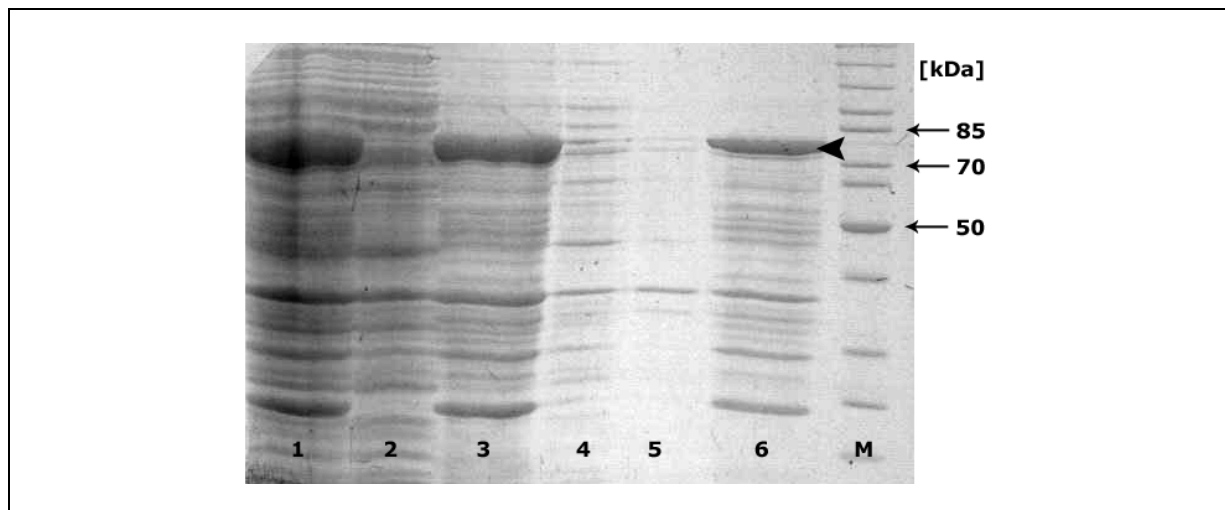


Abbildung 46: Solubilisierung von Inclusion-bodies der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os - cDNA1 von *S. vernalis*). Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Sonifier (siehe 2.12.8) und die Solubilisierung mit 1x Solubilisierungspuffer (siehe 2.12.11) [2% *N*-Lauroylsarcosin, 1 mM DTT für 3 Stunden bei 4°C]. Das Ergebnis der Solubilisierung wurde mit einem 10% SDS-PAGE-Gel nach Coomassie-Färbung untersucht. **1.** Zellysate nach Sonifizierungszellaufschluss **2.** Überstand **3.** Pellet mit IBs **4.** Waschfraktion1 **5.** Waschfraktion2 **6.** solubilisierte SVAO1os (Pfeil) **M.** Proteinmarker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas).

Nach Solubilisierung erfolgte eine native His-Tag-Reinigung (siehe 2.12.9.1) mit den solubilisierten SVAO1os-IBs. Damit sollten Bakterienproteine abgetrennt und das solubilisierte SVAO1os-Protein angereinigt werden. Das solubilisierte SVAO1os-Protein lies sich durch die native His-Tag-Reinigung anreinigen (siehe Abbildung 47).

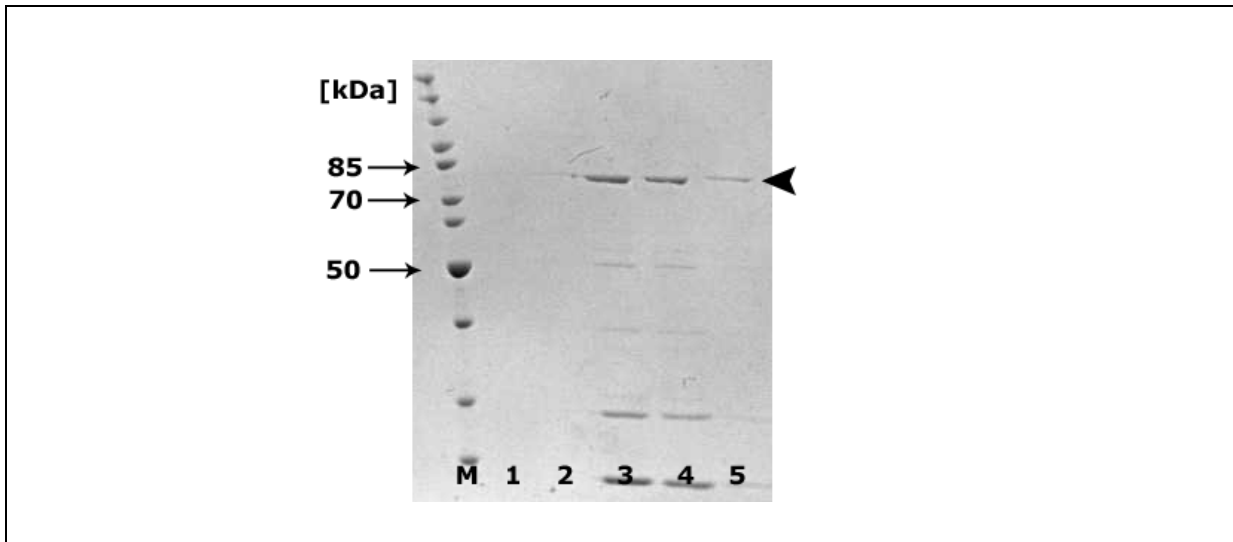


Abbildung 47: Native His-Tag-Reinigung von solubilisierten Inclusion-bodies der SVAO1os (cdNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) (siehe 2.12.9.1). Die Solubilisierung erfolgte mit 1x Solubilisierungspuffer [2% *N*-Lauroylsarcosin, 1 mM DTT für 3 Stunden bei 4°C] nach Zellaufschluss mit dem Sonifier (siehe 2.12.5.1). Anschließend wurde die Solubilisierung mit einem 10% SDS-PAGE-Gel nach Coomassie-Färbung untersucht (siehe 2.12.1). **M.** Proteinmarker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) **1-5.** Elutionsfraktionen der solubilisierten IBs.

Nach einer His-Tag-Reinigung wurde das meiste SVAO1os-Protein im Durchlauf nachgewiesen, so dass die Dialyse zu keinem Erfolg führte, da das wenige, gereinigte Protein im Dialyseschlauch ausgefallen war. Durch die Solubilisierung waren einige *E. coli*-Proteine abgetrennt worden und es lag ein recht reines SVAO1os-Protein vor. Deshalb erfolgte eine Dialyse ohne eine vorhergehende His-Tag-Reinigung.

Die Dialyse wurde bei 4°C für 2 bis 12 Tage in 1x Dialysepuffer durchgeführt, der mit 10 µM Cu(II)-Ionen zur Unterstützung der TPQ-Bildung (siehe 1.5) und 12 µM PMSF zur Hemmung des Proteinabbaus durch Proteasen versetzt wurde. Es wurden 10-20 ml solubilierte Proteinlösung in einem Dialyseschlauch in 500 ml Dialysepuffer unter Rühren dialysiert. Am 1. Tag wurde der Dialysepuffer das erste Mal nach 3 Stunden gewechselt. Anschließend erfolgte jeden Tag ein Pufferwechsel. Am 2. Dialysetag wurden 0,1 mM DTT in den Dialysepuffer zugefügt. DTT stabilisiert in geringen Konzentrationen Proteine, die wie auch CAOs freie SH-Gruppen besitzen [Floris et al., 1983]. Bei einigen Dialyse-Versuchen wurde am 2. Tag zur Unterstützung der Rückfaltung zusätzlich ein Chaperon-Rohextrakt der Hsp70-Familie (siehe 3.7.2) in den Dialyseschlauch gegeben (Gesamtextraktkonzentration von 120-160 µg/ml, Proteinbestimmung des Gesamtextraktes nach Bradford – siehe 2.12.4). Diese Art der Renaturierung hat bei der rekombinanten Lipase gute Ergebnisse erzielt [Quyen et al., 1999]. Nach Umpufferung und Konzentrierung des Dialysates (siehe 2.12.5.1 und 2.12.5) wurden Aktivitätstests (siehe 2.15.6, 2.16.1 und 3.8.2.8) mit den Substraten Homospermidin, Putrescin, Spermidin und Spermin durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation mit 0,3 U/µl Catalase, 0,1 U/µl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH bei 30°C für 0,5 bis 20 Stunden. Auffällig war bei den Aktivitätsversuchen, dass ein Umsatz in einem kleinen Ansatz (30 µl) auftrat, wenn auch nicht reproduzierbar, aber nicht in einem größeren Ansatz (>100 µl). Deshalb wurden

einige Variablen, die einen Einfluss auf die Aktivität haben könnten, verändert (siehe 3.8.2.8 - Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os) nach Expression in *E. coli*-Zellen und Renaturierung durch Dialyse). Trotz 0,5 mM FAD-Zusatz (siehe 3.8.2.7), 0-80 μ M Cu(II)-Ionen-Zusatz zur Unterstützung der TPQ-Bildung (siehe Einleitung - 1.5), Dialyse von 2 Tagen bis 3 Wochen zur Bestimmung des Zeitpunktes, an dem das meiste aktive Proteine vorlag, Veränderung des pH-Wertes des 0,1 M Kaliumphosphat-Assaypuffers (pH-Wert 6, 7 und 9) und Veränderung des Inkubationspuffers (20 mM TRIS – Dialysepuffer), war keine Veränderung im Substratumsatz zu messen.

Als der Inkubationsansatz mit mehr Sauerstoff versorgt und mit mehr Catalase (0,7 U/ μ l) versetzt wurde, konnte in einem 250 μ l Ansatz ein Umsatz mit 150 μ M Putrescin als Substrat nach einer Stunde Inkubation bei 30°C gemessen werden (siehe 2.15.6 und 3.8.2.8). Auf diese Weise wurde ein verstärkter Abbau von Wasserstoffperoxid und auch der verbesserte Ablauf der oxidativen Halbreaktion erreicht (siehe Einleitung - Abbildung 7). Putrescin wurde zu einer Substanz mit einem R_F -Wert von 0,9 (Polyamin-Fließmittel) umgesetzt.

Zur Optimierung der Inkubationsbedingungen wurden zwei Puffer und verschiedene pH-Werte getestet. Dabei war ein größerer Umsatz im 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (mit 1 mM DTT) als in einem 20 mM TRIS-Dialysepuffer (mit 1 mM DTT) zu messen. Bei einer Variation des pH-Wertes des Puffers von 4,5; 7 und 9 mit einer Putrescinkonzentration von 10 μ M und 25 μ M war der größte Umsatz bei pH-Wert 7 zu detektieren.

Es wurde auch der Einfluss der Chaperone auf die Rückfaltung des SVAO1os-Proteins getestet (siehe oben und Tabelle 50). Dazu erfolgte eine Dialyse mit und ohne Chaperon-Zusatz im Dialyseschlauch. Aktivitäten wurden bei Konzentrationen von etwa 280 μ g/ml Gesamtprotein ohne Chaperone (mit Chaperon-Extrakt im Dialysat: 480 μ g/ml Gesamtprotein) und nach 4 Tagen Dialyse festgestellt. Auffällig war, dass keine Enzymaktivität vorhanden war, wenn die Proteinkonzentration (siehe 2.12.4) ca. 1 mg/ml betrug. Dann fiel während der Inkubation das Protein aus. Zur Bestimmung der optimalen Dialysedauer erfolgte eine Dialyse für zwei Tage und sieben Tage. Es wurde jeweils kein Umsatz mit Putrescin als Substrat gemessen (leider fehlte hier der 4-Tage-Dialyse-Vergleichswert).

Eine Erhöhung des Umsatzes war durch den Zusatz von Chaperon-Extrakt bei der Dialyse nicht reproduzierbar nachzuweisen (siehe Tabelle 50). Ein Zusatz von 10 bis 25 μ M Putrescin in einem 250 μ l Inkubationsansatz zeigte nach einer Stunde bei 30°C den höchsten Umsatz. Um festzustellen, ob der Umsatz durch eine CAO- bzw. Polyaminoxidase entstanden ist, wurde 1 mM β -Hydroxyethylhydrazin (HEH) in den Inkubationsansatz gegeben. Eine vollständige Hemmung trat nicht ein. Ein ähnliches Verhalten trat auch bei den hier durchgeführten Versuchen (siehe 3.1.2) mit der Rinderplasma-Aminoxidase (BPAO) mit Spermidin als Substrat auf. Dort war die Hemmung erst nach längerer Inkubation vollständig. Es bleibt unklar, ob eine Reaktion durch eine CAO erfolgt ist.

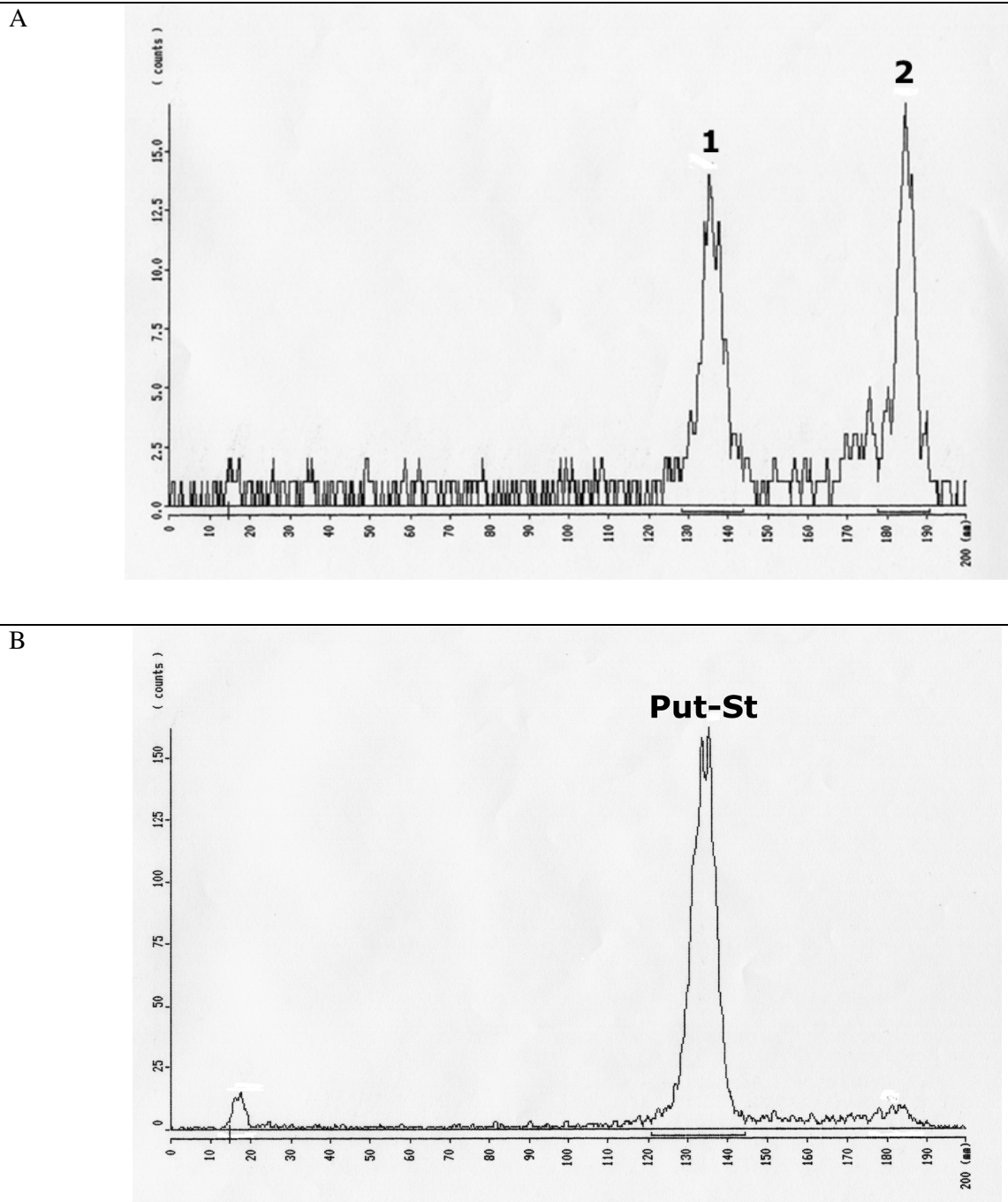


Abbildung 48: Chromatogramm der SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) mit Putrescin als Substrat. Nach der Solubilisierung der SVAO1os fand für 4 Tage eine Dialyse bei 4°C ohne Chaperon-Zusatz im Dialyseschlauch statt. Die Inkubation erfolgte mit 0,7 U/μl Catalase, 0,1 U/μl ADH, 1 mM NADH, 8 μM Cu²⁺, [¹⁴C]Putrescin und 25 μM Putrescin für 1 Stunde bei 30°C unter Schütteln in einem 250 μl Ansatz (Sauerstoffversorgung während der Inkubation: offenes Gefäß, mit seitlicher Druckluftzufuhr und alle 5 min mit geschlossenem Deckel vortexen). Von der Probe wurden 10 μl auf eine DC aufgetragen und im Polyamin-Fließmittel entwickelt. Die Detektion erfolgte über das RITA-System.

A 1: Putrescin, 2: Produkt (hier: R_F-Wert: 0,92) **B.** Putrescin-Standard (R_F-Wert 0,65)

Putrescin [μM]	A		B			
	Chaperone ohne	mit	ohne Chaperone HEH	HEH	mit Chaperone HEH	HEH
0,5	0%	11%	-	-	-	-
1	13%	12%	-	-	-	-
2	17%	10%	-	-	-	-
10	18%	11%	31%	44%	42%	48%
25	14%	-	50%	42%	56%	45%
50	7%	8%	43%	34%	50%	34%
100	-	-	37%	-	33%	25%

Tabelle 50: Einfluss des Chaperonzusatzes während der Dialyse zur Unterstützung der Faltung der solubilisierten Inclusion-bodies von SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) sowie Einfluss des Hemmstoff HEH (1 mM) bei der Inkubation.

A: Versuch zur Untersuchung des Einflusses der Chaperone, B: Versuch zur Untersuchung des HEH-Einflusses. Nach 4 Tagen Dialyse erfolgte die Inkubation mit 0,7 U/ μl Catalase, 0,1 U/ μl Alkoholdehydrogenase, 8 μM Cu(II)-Ionen, 1 mM NADH, [^{14}C]Putrescin und [^{12}C]Putrescin in 250 μl Lösung für 1 h bei 30°C, mit seitlicher Druckluftzufuhr in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (1 mM DTT, pH-Wert: 7). Dabei wurde geschüttelt und mit offenem Gefäßdeckel inkubiert und alle 5 min mit geschlossenem Deckel gevortexet. 10 μl Probe wurden auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte im Polyamin-Fließmittel und die Messung mit RITA-System. Produkt-Anteil in % (Substanz mit dem R_f -Wert von 0,9), -: kein Messwert vorhanden (siehe 2.16.1).

Die hier erhaltenen Messergebnisse sind nur Tendenzen (siehe Tabelle 50), da die Art der Sauerstoffversorgung der Optimierung bedarf. Denn die Druckluftzufuhr war nicht reproduzierbar einstellbar und auch das Durchmischen der Proben war nicht konstant möglich. Ein weiteres Problem war, dass durch die seitliche Luftzufuhr die Proben während der Inkubation aufkonzentriert wurden.

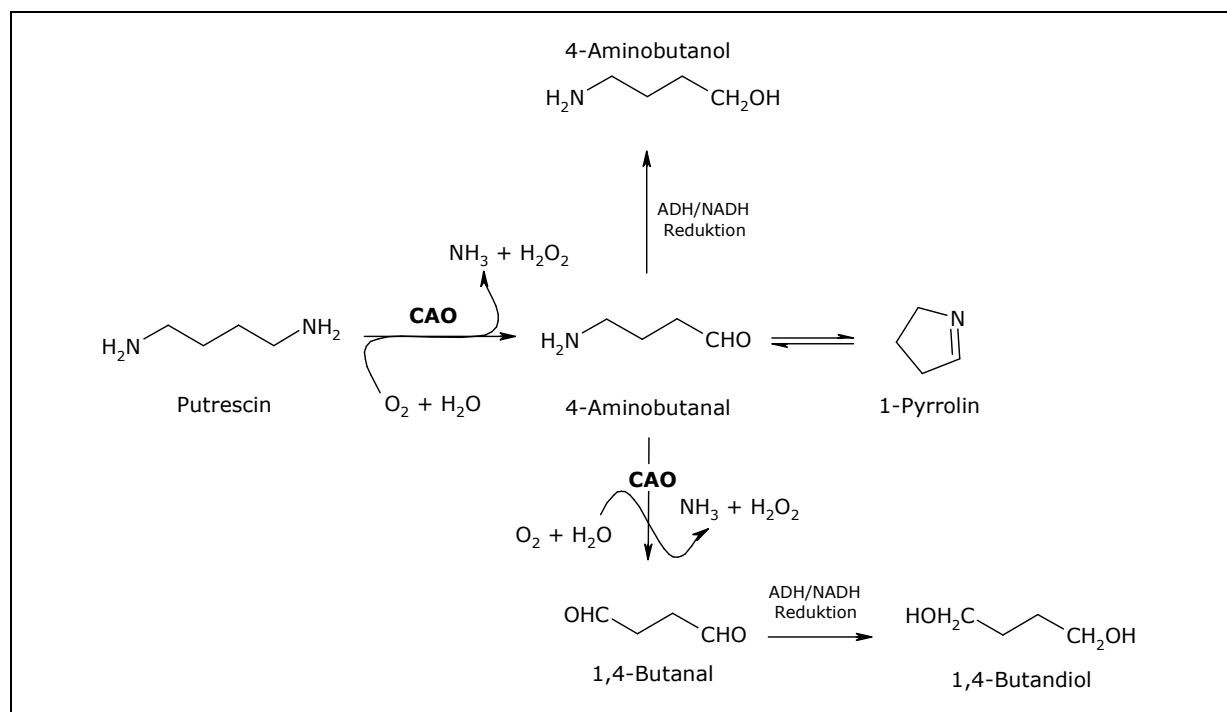


Abbildung 49: Möglicher Reaktionsablaufs (Produkte) einer SVAO1os-Inkubation (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) mit Putrescin als Substrat.

Die bei der SVAO1os-Inkubation mit Putrescin als Substrat entstandene Substanz (R_f -Wert: 0,9 im Polyamin-Fließmittel siehe Abbildung 48) muss durch GC-MS-Messungen identifiziert werden, um

Aussagen über die erfolgte Reaktion machen zu können. Es könnten u. a. folgende Produkte entstanden sein: 1-Pyrrolin, 4-Aminobutanal, 1-Aminobutanol, 1,4-Butanal oder 1,4-Butandiol (siehe Abbildung 49). Auch könnten zwei entstandene Aldehydgruppen durch eine Aldolkondensation miteinander reagiert haben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Produkt nicht identifiziert werden.

3.7.4. Heterologe Expression der SVAO1 und SVAO2 aus *S. vernalis* in *P. pastoris*

Da bei der heterologen Expression der SVAO1 und SVAO2 (cDNA1 und cDNA2 mit Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) in *E. coli* Inclusion-bodies (IBs) aufgetreten waren (siehe 3.7.1), wurde parallel zur Solubilisierung (siehe 3.7.3) und Coexpression (siehe 3.7.2) die SVAO1 mit Signalpeptidsequenz in *Pichia pastoris*-Zellen transformiert und exprimiert. Dieser Eukaryot kann im Gegensatz zu *E. coli* eukaryotische posttranslationale Modifikationen eines Proteins durchführen, so dass eukaryotische Proteine häufig in ihrer aktiven Form vorliegen, die sonst als inaktive Inclusion-bodies in *E. coli* entstehen würden (weitere Erläuterungen siehe 3.1.1.2).

3.7.4.1. Heterologe Expression der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz in *P. pastoris* (SVAO1)

Klonierung der SVAO1

Es wurden genspezifische Expressionsprimer (siehe 2.9.2.2) zur Klonierung des offenen Leserahmens der SVAO1 in den pPICZB-Vektor (siehe Tabelle 4) entworfen. Erst sollte erst die SVAO1 mit Signalpeptidsequenz kloniert und exprimiert werden, da noch keine Informationen über den Einfluss der SVAO-Signalpeptidsequenz auf die Expression in *P. pastoris* im Institut vorlagen. Falls keine Expression messbar war, sollte anschließend die SVAO-Sequenz ohne Signalpeptidsequenz kloniert und exprimiert werden. Durch den pPICZB-Vektor verbleibt das heterolog exprimierte Protein in der Hefe-Zelle, da er kein α -Faktor-Sekretionssignal von *S. cerevisiae* besitzt. Die entworfenen Primer besitzen am 5'Ende eine *Sfi*I-Schnittstelle vor der Hefekonsensus-Sequenz nach Kosak und dem Start-ATG und am 3'Ende eine *Not*I-Schnittstelle (siehe Tabelle 51).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-ExpSV1-for1-kw	5'-ATAA <u>GGCCCAGCCGGCC</u> AATA ATG TCT ATG AGG AAA TAT TTT TGT GCT CAA TTC TTC-3' SVAO1 mit Signalpeptid forward T_m: 74,4°C <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
SD-ExpSV1-rev1-kw	5'-ATAT <u>GCGGCCGC</u> ATA AGA GCG AGC CAC GGA ACA CAC G-3' SVAO1 mit Signalpeptid reverse T_m: >75°C <i>Not</i> I-Schnittstelle

Tabelle 51: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (cDNA1 aus *S. vernalis*) zur Expression in *Pichia pastoris*. Die Restriktionsschnittstellen sind fett unterstrichen, die Hefekonsensussequenz nach Kosak ist unterstrichen und das Start-ATG dick gedruckt. Das Stopp-Codon wird durch den pPICZB-Vektor definiert, der am 3'-Ende einen His-Tag codiert.

Es wurde Gesamt-RNA aus drei Tage alten Wurzelorgankulturen von *S. vernalis* isoliert. Nach Umschreiben von der Gesamt-RNA in cDNA (siehe 2.10.1 und 2.10.3.1) erfolgte eine PCR mit Hilfe

der *Pfx*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.3) und den genspezifischen Primern SD-ExpSV1-for1-kw und SD-ExpSV1-rev1-kw.

95°C	3 min	
95°C	45 sec	} 20 x -0,5°C/Zyklus
68°C	1 min	
72°C	3 min	
95°C	45 sec	} 20 x
58°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Ein aufgereinigtes 2261 bp großes PCR-Produkt (siehe 2.10.9.1) und der pPICZB-Vektor wurden erst mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Not*I geschnitten (siehe 2.10.7). Nach erneuter Aufreinigung wurde bei 25°C ligiert (siehe 2.10.8) und das Ligationsprodukt in *E. coli* TOP10-Bakterienzellen transformiert (siehe 2.10.11). Ein durch Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Pme*I (siehe 2.10.12.2) positiv getestetes und kontrollsequenziertes Plasmid (siehe 2.10.9.4) wurde durch eine Midi-Präparation oder Säulenaufreinigung in höherer Konzentration (ca. 1 µg/µl) gewonnen (siehe 2.10.9.1 und 2.10.9.3). Zur Linearisierung des erhaltenen Plasmids wurden insgesamt 20 µg mit dem Restriktionsenzym *Pme*I über Nacht geschnitten und elektrophoretisch aufgereinigt (siehe 2.10.16.1). Da nur ein Maximalvolumen von 10 µl zu 100 µl kompetenten Hefezellen (siehe 2.10.16.2) gegeben werden darf, musste die DNA-Lösung aufkonzentriert werden. Dieses wurde durch Ethanolfällung (siehe 2.10.13) oder durch das QIAEXII-Kit (Qiagen) (siehe 2.10.9.1) erreicht. Eine Transformation des linearisierten Plasmids erfolgte in die Hefestämme KM71H und GS115 (siehe Tabelle 3) durch drei verschiedene Methoden: PEG 1000, EasyCompTM und Elektroporation (siehe 2.10.16.2). Anschließend wurden die erhaltenen Klone durch verschiedene Methoden auf eine homologe Rekombination des linearisierten Plasmids in das Hefegenom überprüft (siehe 2.10.16.3). Eine Isolation der genomischen DNA mit einer Handmethode war langsam, verursachte geringe Kosten, war giftig und effektiv. Das direkte PCR-Screening mit der *Taq*-DNA-Polymerase zeigte sich schnell und stör anfällig. Das Kit von Qiagen zur Isolierung von genomischer DNA aus Hefe in Kombination mit dem ACCUTAQ LA DNA Polymerase MIX (Sigma) erwies sich als einfach, schnell und reproduzierbar.

Expression der SVAO1

Bei einer Expression der SVAO1 in *P. pastoris* wurden die Versuche mit positiv getesteten Transformanten des KM71H-Stamms ausgeführt (siehe Tabelle 3), da hier nur der Mut^S-Typ vorhanden sein konnte (siehe 3.1.1.2). Über Vorversuche sollten die optimalen Induktionsbedingungen für die transformierten Hefezellen herausgefunden werden. Dabei wurden die Zellen in einer Vorkultur angezogen und anschließend in der Hauptkultur mit 0,5%, 1% und 2% Methanol über eine Woche induziert. Am ersten Tag wurde alle 2 Stunden und anschließend nur einmal am Tag eine

Probe genommen (siehe 2.12.13.1). Die Expression wurde im Pellet nach Glasperlenzellaufbruch und im Überstand nach TCA-Fällung mit einer SDS-PAGE überprüft (siehe 2.12.13.1, 2.12.1 und 2.12.13.3). Eine Konzentrierung und Aufreinigung der exprimierten SVAO1 von den Hefeproteinen erfolgte durch Affinitätschromatographie mit dem Kulturüberstand und mit dem Überstande, der durch Aufschluss des Zellpellets entstanden war (siehe 2.12.9.1). Es war keine SVAO1-Expression im SDS-PAGE-Gel nachweisbar und es waren auch keine Umsätze mit [^{14}C]Homospermidin oder [^{14}C]Putrescin als Substrat in einem Aktivitätstest messbar (siehe 2.15.6.2 und 3.8.2.7).

Durch mikroskopische Analyse des Zellbruchs konnte festgestellt werden, dass der Zellaufschluss mit den Glasperlen nicht ausreichend war. Deshalb erfolgte der Zellaufschluss durch drei andere Methoden: die Kombination von Glasperlen mit einer Stichsäge, die Kombination Glasperlen mit Sonifier und die „Hefenudeln“ (siehe 2.12.13.3). Nach dem Zellaufschluss wurde der geerntete Überstand über Affinitätschromatographie gereinigt, um eine Konzentrierung sowie eine Abtrennung von Hefeproteinen zu erzielen. Die Reinigung wurde mit SDS-PAGE überprüft (siehe 2.12.1). Es wurde kein Protein in entsprechender Größe (ca. 80 kDa) gebunden. Dafür war eine stark konzentrierte Proteinbande in Höhe von ca. 38 kDa nachweisbar (siehe Abbildung 50 Bahn 4 und 5). Es stellte sich die Frage, ob diese durch SVAO1-Proteinabbau entstanden war oder ob es sich um ein Hefeprotein handelte. Durch ESI-MS/MS-Sequenzierung (siehe 2.10.14.3) von Proteinen/Peptiden wurde diese Bande als Alkoholdehydrogenase der Hefe identifiziert. Im Methanolstoffwechsel von *P. pastoris* oxidieren zwei Dehydrogenasen den durch die Alkoholoxidase entstehenden Formaldehyd über Ameisensäure zu Kohlendioxid [Cereghin und Cregg, 2000].

Obwohl keine SVAO1-Proteinbande in entsprechender Größe im SDS-PAGE-Gel sichtbar war, wurden Aktivitätstests mit dem aufkonzentrierten Überstand (siehe 2.12.5) und in dem Zelllysat mit [^{14}C]Homospermidin und [^{14}C]Putrescin als Substrat durchgeführt. Es war kein Umsatz messbar (siehe 2.15.6 und 2.16.1).

Keine der oben genannten Aufschlussmethoden war in der Lage die Hefezellen so aufzubrechen, dass der Anteil lebender Zellen kleiner war als der Zellbruchanteil. Als Leihgabe stand dem Institut für kurze Zeit eine French[®]Press der Firma Polytec zur Verfügung, die in der Lage ist, durch hohen Druck und plötzliche Entspannung, die harte Zellwand der Hefen zu zerstören. Einige positiv getestete Transformanten wurden in einer Vorkultur angezogen und dann in einer Hauptkultur (1/10tel Volumen der Vorkultur) mit 0,5-1% Methanol für 2 bis 7 Tage induziert (siehe 2.12.13.1). Die mikroskopische Analyse des Zellpelletaufbruchs zeigte einen verbesserten Zellaufschluss nach zwei Durchgängen mit der French[®]Press (siehe 2.12.13.3). Der Rohextrakt enthielt sehr viele Proteine, so dass eine Affinitätsreinigung notwendig war. Mit Hilfe der Talon[®]-Säulen-Reinigung (siehe 2.12.9.3), mit der schon viele in Hefe exprimierte Proteine erfolgreich aufgereinigt worden sind [Anderson et al., 2005; Salnikova et al., 2005], wurde das Zelllysat aufgereinigt. An das Talon[®]-Säulenmaterial wurde die Alkoholdehydrogenase nur sehr schwach gebunden (siehe Abbildung 50 Bahn 2 und 3). Dafür koppelte ein Protein in der erwarteten Größe der SVAO1 von ca. 80 kDa an die Matrix. Durch ESI-

MS/MS-Sequenzierung von Proteinen/Peptiden wurde die 80 kDa Proteinbande jedoch als ein Hefeprotein (Dehydroxyaceton synthase) identifiziert (siehe 2.10.14.3). Im Methanolstoffwechsel von *P. pastoris* bildet eine Dihydroxyaceton synthase aus Formaldehyd über Xylose-5-Monophosphat, Glyceraldehyd-3-phosphat und Dehydroxyaceton [Cereghin und Cregg, 2000].

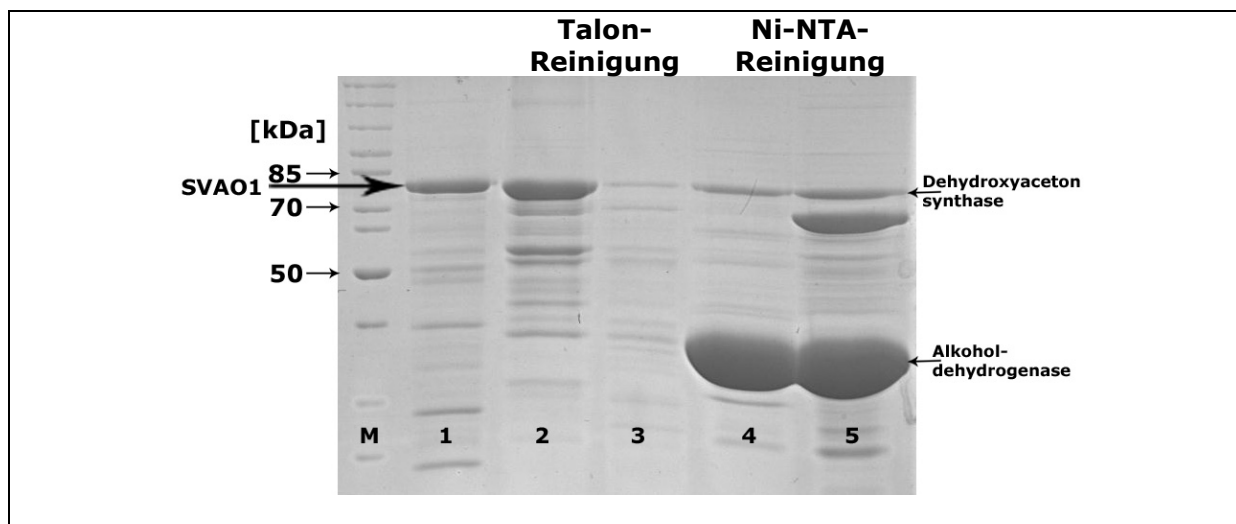


Abbildung 50: Vergleich einer Nickel-NTA-Agarose-Reinigung (Qiagen) mit der Talon®-Material-Reinigung (Clontech) eines French®Press-Aufschlusses (siehe 2.12.9.1 und 2.12.9.3) von zwei Expressionen der SVAO1 (cDNA1 aus *S. vernalis*) in *Pichia pastoris*. Nach der Induktion mit Methanol wurde des Zellpellet geerntet, mit der French®Press aufgeschlossen und nach Umpufferung das Lysat gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert. Die Reinigung wurde mit einem 10% SDS-PAGE-Trenngel nach Coomassie-Färbung überprüft (siehe 2.12.5.1)

M. Marker **1.** Vergleich: solubilisiertes *E. coli*-cDNA1-Protein (SVAO1 ca. 80 kDa) **2.** Talon-Material Klon 1 **3.** Talon-Material Klon 2 **4.** Ni-NTA-Material Klon1 **5.** Ni-NTA-Material Klon 2

Auch wurde ein Aktivitätstest mit [^{14}C]Homospermidin, [^{14}C]Putrescin, [^{14}C]Spermidin und [^{14}C]Spermin als Substrat und den aufkonzentrierten, umgepufferten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie und mit dem Rohextrakt (siehe 2.12.9) durchgeführt. Als Zusätze wurden 0,3 U/ μl Catalase, 0,1 U/ μl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH verwendet. Es wurden Cu(II)-Ionen (0 bis 80 μM) zugesetzt, um die Bildung des TPQs zu unterstützen (siehe 1.5). Nach einer 20 h Inkubation bei 30°C war ein Umsatz mit [^{14}C]Homospermidin in einem 30 μl Ansatz zu messen. Durch Kontrollinkubationen von [^{14}C]Homospermidin als Substrat mit einer Waschfraktion der Talon®-Material-Aufreinigung und den aufkonzentrierten, umgepufferten, induzierten Elutionsfraktionen eines untransformierten *P. pastoris*-KM71H-Klons konnte gezeigt werden, dass die gemessene Aktivität nicht durch ein exprimiertes Protein erfolgt war. Denn hier waren die gleichen Umsätze zu messen.

3.7.4.2. Klonierung der SVAO2 mit Signalpeptidsequenz in *P. pastoris* (SVAO2)

Die SVAO2 mit Signalpeptidsequenz (cDNA2 aus *S. vernalis*) sollte auch mit dem Hefeexpressionssystem exprimiert werden. Nach Restriktionsschnittstellenanalyse der SVAO2-Sequenz (siehe 2.10.14.2) sowie den im Institut vorhandenen *P. pastoris*-Expressionsvektoren (siehe

Tabelle 4) wurde festgestellt, dass keine der vom Vektor vorgegebenen Schnittstellen zum Linearisieren in Frage kam, da sie in der SVAO2-Sequenz schnitten. Durch eine „Site-directed Mutagenesis“ (siehe 2.10.15.2) sollte eine *NdeI*-Schnittstelle zum Linearisieren in die 5'-*AOXI*-Promotor-Region der Expressionsvektoren pPICZB und pPICZ α A (siehe Tabelle 4) eingeführt werden. Dafür wurden zwei Mutationsprimer entworfen (siehe Tabelle 52).

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-for- <i>NdeI</i> piczmut	5'-TGT GCC GAA ACG CATATG GGG AAA CAC CC-3'
	forward-Primer T_m: 69,5°C
SD-rev- <i>NdeI</i> piczmut	5'-GGG TGT TTC CC CATATG C GTT TCG GCA CA-3'
	reverse Primer T_m: 69,5°C

Tabelle 52: Primer für die „Site-directed Mutagenesis“ mit den Hefektoren pPICZB und pPICZ α A zur Einführung einer *NdeI*-Schnittstelle zum Linearisieren.

Nach erfolgreicher PCR und *DpnI*-Restriktion (siehe 2.10.15.2) wurden aus *E. coli* XL1Blue-Zellen (siehe Tabelle 2) die veränderten Vektoren isoliert (siehe 2.10.9.4) und mit Hilfe von Restriktionsenzymen (siehe 2.10.12.2) sowie durch Kontrollsequenzierung überprüft. Die weitere Klonierung der SVAO2 in die veränderten Vektoren steht noch aus.

3.8. Etablierung eines Assays für die CAO

Eine große Anzahl an Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität von kupferhaltigen Aminoxidasen ist in der Literatur bekannt. Um eine einfache und empfindliche Methode am Institut zu etablieren, wurden verschiedene Methoden mit Hilfe der Aminoxidase von *Pisum sativum* (PSAO) getestet.

3.8.1. Photometrie

Eine Methode zur indirekten Aktivitätsmessung ist eine Messung des entstehenden Produktes Wasserstoffperoxid über Kolorimetrie (siehe Reaktion in 1.5).

Es wurden drei Methoden (siehe 2.15.5) mit Hilfe von Erbsenrohextrakten getestet, die von 7 bis 12 Tage alten, im Dunkeln gewachsenen Pflanzen (siehe 2.12.7) stammten. Die erste Methode nach Nag [2000] basiert auf der Bildung eines Wasserstoffperoxid-Titankomplexes, der bei 410 nm gemessen wurde. Die Messung der Bildung eines gelben Eisen-Xylenolorange-Komplexes gemäß Cona et al. [1993] fand bei 582 nm statt und die dritte Methode, der ABTS-Methode (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenz-thiazolinsulfonsäure) nach Szutowicz et al. [1984] basierte auf der Bildung eines graublauen Farbproduktes mit einem Absorptionsmaximum bei 414 nm. Die Bestimmung einer Kalibrierkurve bei den drei Methoden war reproduzierbar möglich. Aber eine Messung von Enzymaktivitäten eines *P. sativum*-Rohextraktes mit Putrescin als Substrat zeigte bei allen drei Methoden keine reproduzierbaren Ergebnisse. Deshalb wurde die Photometrie zur Bestimmung von CAO-Enzymaktivitäten verworfen.

3.8.2. Radioaktives Assay

Nachdem die Messung von CAO-Enzymaktivitäten durch die Photometrie keine reproduzierbaren Ergebnisse geliefert hatte (siehe 3.8.1), wurde ein radioaktives Assay als Methode angewendet. Dieses Assay wurde im Laufe dieser Arbeit ständig weiterentwickelt, so dass die Inkubationsbedingungen ständig variierten und optimiert wurden. Es gab bis zum Ende dieser Arbeit kein Standardassay.

3.8.2.1. Identifizierung von Reaktionsprodukten in Reaktionsansätzen nach einer Inkubation durch Dünnschichtchromatographie

Zur Identifizierung von entstandenen Produkten nach einer Inkubation (siehe 3.1, 3.2 und 3.7) wurden die R_f -Werte von einigen Necinbase-Grundkörpern, Polyaminen und anderen Substanzen als Standards in verschiedenen Fließmitteln (siehe 2.16.1.1) gemessen.

Trachelanthamidin und das stereoisomere Isoretronecanol (siehe Abbildung 51) sollten nach der Zyklisierung von Homospermidin zum Iminiumion als Primärprodukte nach Reduktion der Carbonylgruppe zur Hydroxylgruppe entstehen (siehe Abbildung 2 und Abbildung 20), so dass diese radioaktiv [^3H]markierten Standards als Referenz für den Necinbasekörper am interessantesten erschienen.

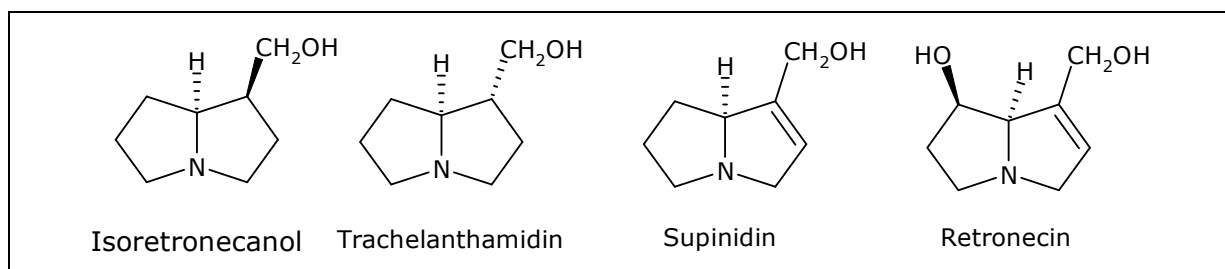


Abbildung 51: Grundkörper verschiedener Necinbasen.

Substanz	R_f -Wert Polyamin-FM	R_f -Wert TAS-FM	R_f -Wert PA-FM
Isoretronecanol	0,16	0,19/ 0,29	0,10/ 0,15
Supinidin	0,55	0,36/ 0,57	0,25/ 0,22
Retronecin	0,55	0,49	0,18
Verbindung „X“	0,21	0,17	0,16
γ -Aminobuttersäure (GABA)	0,63	0,00	0,00
1-Pyrrolin [siehe 3.9.1]	0,70	0,00	0,00
NAD^+	0,34	-	-
Gabaculin	0,68	-	-
Putrescin	0,55	0,01	0,01
Homospermidin	0,24	0,02	0,01
Spermidin	0,29	-	-
Spermin	0,11	-	-

Tabelle 53: Dünnschichtchromatographisch gemessene R_f -Werte von Standards in drei verschiedenen Fließmitteln (siehe 2.16.1). Fett gedruckte Werte: nach Frölich [1996], -: keine Werte bestimmt. Die Verbindung „X“ wurde als Zwischenprodukt bei einer Necinbase-Biosynthese durch C. Frölich [1996] identifiziert.

Da keine Trennung von Polyaminen in dem TAS- und PA-Fließmittel erfolgte, wurden die Substanzen aus Inkubationsansätzen meist mit Hilfe des Polyamin-Fließmittel aufgetrennt. Dieses Fließmittel

enthält 25% Ammoniak. Deshalb sollten immer Standards mit auf die DC-Platte aufgetragen werden, da der Ammoniak durch Verdunstung seine Konzentration bei längerer Lagerung in der Flasche verändert. Aus diesem Grund wurden auch teilweise unterschiedliche R_F -Werte bei den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen ermittelt, da die DC-Chromatogramme ein leicht verändertes Trennverhalten zeigten.

3.8.2.2. Abbau von Polyaminen während Inkubationen durch Chaperone

Bei Durchführung von Assays mit den rekombinanten SVAO-Proteinen, die bei der Coexpression mit Chaperonen (siehe 3.7.2) exprimiert worden waren, konnte ein Abbau einiger Substrate schon nach einer Stunde ohne Zusatz von rekombinantem SVAO-Protein gemessen werden (siehe Tabelle 54). Diese neu entstandenen Peaks wurden als Referenzchromatogramm aufgenommen und von den Inkubationsversuchen als Blindwert subtrahiert. Auf diese Weise konnte die Aktivität den Chaperonen oder dem rekombinanten Proteinen zugeordnet werden.

Substrat	R_F -Werte im Polyamin-Fließmittel			
Putrescin	0,56 (100%) Put			
Homospermidin	0,24 (100%) Hpsd			
Spermidin	0,29 (42%) Spd	0,57 (21%)	0,63 (36%)	
Spermin	0,02 (17%)	0,11 (34%)	0,32 (23%)	0,67 (25%) Spm

Tabelle 54: R_F -Werte von erhaltenen Peaks nach Inkubation von Polyaminen mit Hsp70-Chaperonen (Anteil in Prozent der insgesamt gemessenen Radioaktivität).

Putrescin und Homospermidin zeigten keine Veränderung im aufgezeichneten Spektrum, während die Polyamine Spermin und Spermidin in drei bzw. zwei Verbindungen von den Hitzeschockproteinen abgebaut worden sind. Dieses Verhalten kam unerwartet und Bedarf weiterer Analyse.

3.8.2.3. Etablierung eines Radio-Assays für CAOs

Die Aktivität von CAOs wird häufig durch Szintillationsmessung nach Extraktion des Inkubationsansatzes mit Toluol nach Okuyama und Kobayashi [1961] bestimmt. Da aber eine CAO des Pyrrolizidin-Alkaloid-Stoffwechsels gesucht wurde und diese von den CAOs des Primärstoffwechsels unterschieden werden musste, wurde als Bestimmungsmethode die Dünnschichtchromatographie zur Trennung von Substrat und Produkten ausgewählt. Über Vergleichssubstanzen und deren R_F -Werte konnten einige Peaks identifiziert werden.

3.8.2.4. Positivkontrollassay - Erbsenrohextrakte

Um das Verhalten einer CAO des Primärstoffwechsels kennen zu lernen, wurden umgepufferte Erbsenrohextrakt von 7 bis 13 Tage alten, im Dunkeln gewachsenen Pflanzen mit Putrescin, Spermidin oder Homospermidin als Substrat in Kaliumphosphatpuffer inkubiert (weitere Ausführungen siehe 3.2.1 – Charakterisierung von Aktivitäten in *Pisum sativum*-Rohextrakten). Als Pufferkonzentration wurde standardmäßig 0,1 mol/l und ein pH-Wert von 7 gewählt. Dies sind die

Standardpuffer bzw. Pufferkonzentrationen für Aktivitätstest von kupferhaltige Aminoxygenasen (*Pisum sativum* nach Macholan und Haubrova [1976], *Lens culinaris* nach Cona et al. [1993], *Oryza sativa* nach Chaudhuri und Gosh [1984], *Arachis hypogea* nach Hagiwara [1994] und *Euphorbia characias* nach Rinaldi et al. [1982]).

Umgepufferte Erbsenrohextrakte wurden mit [14 C]Putrescin oder [14 C]Spermidin als Substrat versetzt (Endkonzentration: 4000 cpm/ μ l; 1,25 μ Ci/ μ l; 0,0117 mM) und bei 37°C bis zu 60 min inkubiert. Anschließend wurde mit Dünnschichtchromatographie (siehe 2.15.6 und 2.16.1) auf Aktivität geprüft. Dabei war Putrescin schon nach fünf Minuten zu zwei Substanzen abgebaut worden (siehe Abbildung 16). Um die Bedingungen zu optimieren, wurde DTT zur SH-Gruppen-Stabilisierung zugesetzt. Ein Zusatz von 2 mM DTT zum Puffer hatte keinen Einfluss auf die Reaktion. Spermidin war nach einer Stunde zu 80-100% zu einer Substanz mit dem R_f -Wert von 0,88 umgesetzt worden (siehe Tabelle 16). Es wurden gleichzeitig entsalzene Erbsenrohextrakte (7-10 d, im Dunkeln angezogen) mit [14 C]Homospermidin als Substrat (Endkonzentration: 0,002 μ Ci/ μ l; 4000 cpm/ μ l 0,01 mM) bei 37°C für eine bis zu 70 Stunden inkubiert (siehe 2.15.5). Es war kein Umsatz messbar. Dann wurden zusätzlich 0,3 U/ μ l Catalase und 0,1 U/ μ l Alkoholdehydrogenase (ADH) dem Inkubationsansatz zugesetzt. Catalase baut das entstehende toxische Wasserstoffperoxid ab, so dass keine Produkthemmung verursacht wurde [Mondovi et al., 1967; Pietrangeli et al., 2000]. Durch den Zusatz von ADH sollte nach der Zyklisierung zum Iminiumion eine Reduktion der Carbonyl- zur Alkoholgruppe stattfinden, um so den Necinbase-Grundkörper gemäß Robins [1982] zu erhalten (siehe Abbildung 20). Eine ADH katalysiert die reversible Umwandlung von Ethanol zu Acetaldehyd. Bei dieser Reaktion muss NAD^+ bzw. NADH für die Reaktion als Co-Substrat vorhanden sein. Deshalb wurde auch 1 mM NADH dem Inkubationsansatz zugesetzt. Es war ein Umsatz nachweisbar (siehe 3.2.1.3). Auch wurde der Zusatz von 1 mM HEH, dem CAO- bzw. PAO-Hemmstoff, untersucht. So sollte bestätigt werden, dass der gemessenen Umsatz durch eine CAO bzw. PAO entstanden war (siehe 1.3). Es erfolgte keine Umsatz bei HEH-Zusatz.

3.8.2.5. Positivkontrollassay – tierische Aminoxygenasen

Parallel wurde neben dem Erbsenrohextrakt die käufliche Diaminoxygenase der Schweineiere (0,002 U/ μ l) mit [14 C]Putrescin als Substrat als Kontrolle inkubiert (siehe 3.2.1). Bei dieser CAO waren keine weiteren Enzyme wie in einem Rohextrakt vorhanden. Da hier keine Nebenreaktionen abliefen, konnten die entstehenden Produkte einer CAO einfacher zugeordnet werden.

Auch das Verhalten einer Rinderplasma-Aminoxygenase (BPAO) mit [14 C]Homospermidin und anderen Substraten nach Lee und Sayre [1998] (siehe 2.15.7.2) wurde untersucht (nähere Ergebnisse sind unter 3.1.2 - Tierische Aminoxygenasen zu finden). Es wurde mit Spermidin und Homospermidin ein Umsatz nachgewiesen. Kein Umsatz erfolgte mit Putrescin.

3.8.2.6. Inkubationen mit Wurzelorgankulturohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat

Homospermidin ist das erste spezifische Zwischenprodukt bei der Necinbase-Synthese im Sekundärstoffwechsel der PA-produzierenden Pflanzen (siehe Einleitung - 1.3). Durch Inkubationen von Wurzelorgankulturohextrakten (WOK) mit [¹⁴C]Homospermidin sollten Erkenntnisse über die entstehenden Produkte sowie einige Eigenschaften des Enzyms, das Homospermidin als Substrat verwendet, gewonnen werden. In den Wurzelorgankulturen von *S. vernalis* und *E. cannabinum* läuft die PA-Biosynthese vollständig ab [Toppel et al., 1987]. Deshalb eignen sie sich sehr gut zur Untersuchung der Biosynthese.

Es wurden aus drei Tage alten WOKs von *S. vernalis* und *E. cannabinum* Rohextrakte hergestellt (siehe 2.12.7). Diese Wurzelrohextrakte wurden mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat (Endkonzentration: 1 nCi/μl bzw. 1000-2000 cpm/μl) inkubiert. Als Zusätze wurden 0,3 U/μl Catalase, 0,1-0,2 U/μl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH (Erläuterungen siehe 3.8.2.4) verwendet. Es wurde zusätzlich 2 mM DTT zur Stabilisierung von SH-Gruppen von Proteinen zum Puffer zugesetzt. Bei einer Inkubation der tierischen BPAO mit [¹⁴C]Homospermidin als Substrat (siehe 3.1.2.1) wurde erst nach zwei Stunden und bei Inkubationen von Erbsenrohextrakten mit [¹⁴C]Homospermidin (siehe 3.2.1.3) erst nach vier Stunden ein Umsatz nachgewiesen. Deshalb wurde hier die Inkubationszeit auf vier bzw. 20 Stunden erhöht. Die Temperatur wurde von 37°C auf 30°C erniedrigt, um so eine Proteindenaturierung während der Inkubation zu minimieren. Durch Dünnschichtchromatographie wurde (siehe 2.15.6 und 2.16.1) auf Aktivität geprüft. Es wurde ein Umsatz nachgewiesen (nähere Ergebnisse siehe 3.2.2 - CAOs aus *S. vernalis* und *E. cannabinum*).

3.8.2.7. Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 mit und ohne Signalpeptidsequenz nach Expression in *E. coli*-Zellen und der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz nach Expression in *P. pastoris*-Zellen

Bei Inkubationen der rekombinanten SVAO1os (cDNA1 ohne Signalsequenz aus *S. vernalis*) und der rekombinanten SVAO1 (cDNA1 mit Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) wurden einige Faktoren variiert, da kein Umsatz mit Homospermidin, Putrescin, Spermin oder Spermidin als Substrat bei 30°C für 1 bis 20 h mit 0,3 U/μl Catalase, 0,1 U/μl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH (siehe 3.8.2.6) zu messen war. Es wurden bis zu 33 μM Cu(II)-Ionen bei einigen Ansätzen zugefügt, um die TPQ-Bildung im aktiven Zentrum zu unterstützen (siehe Einleitung - 1.5). Es wurden auch Inkubationen ohne sämtliche Zusätze durchgeführt, um eine Hemmung durch einen dieser Zusätze auszuschließen. Es war in beiden Fällen kein Umsatz nachweisbar. Die Catalase-Menge wurde bei einigen Versuchen auf 0,7 U/μl erhöht, um verstärkt den entstehenden Wasserstoffperoxid abzubauen, der nach Mondovi et al. [1967] und Pietrangeli et al. [2000] den Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum des Enzyms hemmen kann. Auch wurden Inkubationen mit offenem Gefäßdeckel durchgeführt und bei einigen Inkubationen zusätzlich alle 15 Minuten kräftig mit geschlossenem Deckel geschüttelt, um die Sauerstoffzufuhr im Reaktionsansatz zu erhöhen, da für die Regenerierung des TPQs während der Redoxreaktion Sauerstoff notwendig ist (siehe Einleitung - Abbildung 7). Es war kein Umsatz

nachweisbar. Nach Chaudhuri und Ghosh [1984] enthalten einige CAOs als Cofaktor FAD und oxidieren nur Polyamine, wie z. B. eine CAO des Reiskeimlings. Aus diesem Grund wurde FAD zum Inkubationsansatz in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C und es wurde für 30 Minuten bis zu 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Dünnschichtchromatographie (siehe 2.15.6 und 2.16.1) auf Aktivität geprüft. Es wurde kein Umsatz nachgewiesen (nähere Ergebnisse siehe 3.7.2.2 - Coexpression der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os), siehe 3.7.3.1 - Renaturierung der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1) und siehe 3.7.4.1 - Heterologe Expression der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz in *P. pastoris* (SVAO1)).

3.8.2.8. Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os) nach Expression in *E. coli*-Zellen und Renaturierung durch Dialyse

Da die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Aktivitätstests mit heterolog exprimierten Enzymen nicht zu einer reproduzierbaren und messbaren Enzymaktivität geführt haben (nähere Ergebnisse siehe 3.7.2.2 - Coexpression der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (SVAO1os), siehe 3.7.3.1 - Renaturierung der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz (SVAO1) und siehe 3.7.4.1 - Heterologe Expression der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz in *P. pastoris* (SVAO1)), wurden bei den Inkubationen mit den renaturierten Inclusion-bodies der SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) nach Dialyse einige Veränderungen bei der Aktivitätsmessung durchgeführt. Es wurde die Catalase-Menge auf 0,7 U/μl erhöht und zusätzlich wurde verstärkt Sauerstoff bzw. Luft dem Reaktionsansatz zugeführt. Damit sollte das entstehende Wasserstoffperoxid abgebaut werden, um keine Produkthemmung zu verursachen und auch die Regenerierung des reduzierten TPQs (siehe Einleitung - Abbildung 7) nach Freisetzung des Produktaldehyds durch Sauerstoff zu unterstützen. Als Zusätze wurden 0,1 U/μl Alkoholdehydrogenase, 0,7 U/μl Catalase, 1 mM NADH und 8 μM Cu(II)-Ionen zugefügt (siehe 3.8.2.6). Es wurden als Substrate [¹⁴C]Homospermidin, [¹⁴C]Putrescin, [¹⁴C]Spermidin und [¹⁴C]Spermin mit 0,5 – 150 μM [¹²C]-Zusatz verwendet. Bei den Inkubationen wurde der Ansatz alle 5 Minuten stark gemischt und offen bei 30°C unter Schütteln inkubiert. In einer selbstkonstruierten Apparatur wurden die Eppendorf-Gefäße mit Druckluft seitlich belüftet. Diese Luftzufuhr war leider nicht reproduzierbar einstellbar und nicht gleichmäßig. Ein Problem war auch, dass die eingesetzten Lösungen durch Verdunstung stark eingeeengt wurden. Nach einer Stunde Inkubation wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (siehe 2.15.6 und 2.16.1) auf Aktivität geprüft. Auf diese Weise konnte bei Putrescin und der renaturierten SVAO1os ein Umsatz gemessen werden (nähere Ergebnisse siehe 3.7.3.3 – Renaturierung der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz).

3.9. Herstellung von potentiellen Substraten und Produkten für das CAO-Assay

3.9.1. 1-Pyrrolin

Ein mögliches Produkt bei der Umsetzung von Putrescin durch eine CAO im Primärstoffwechsel der Pflanzen ist 1-Pyrrolin (siehe Einleitung - Abbildung 2). Zur Identifizierung von Peaks, die nach einer dünnschichtchromatographischen Trennung gemessen worden sind, war es nötig einen radioaktiv [^{14}C]markierten Standard herzustellen. Statt *S. vulgaris*-Wurzelorgankulturen, wie Böttcher et al. [1993] sie verwendet hatten, wurde umgepuffter und entsalzener Erbsenrohextrakt von acht Tage im Dunkeln gewachsenen Pflanzen verwendet (siehe 2.15.3). Im alkalischen Milieu war die Extraktion des Produktes mit Hilfe von Diethylether nicht erfolgreich. Deshalb wurde der radioaktivmarkierte Standard ohne Aufreinigung als wässriges Gemisch weiterverwendet. Da keine Identifizierung der Substanzen mittels GC-MS-Messung erfolgte, könnte auf Grund der vielen vorhandenen Enzyme im Rohextrakt der Erbse noch andere Substanzen außer 1-Pyrrolin entstanden sein (siehe 3.2.1.1). Als Standard war dieser Extrakt nicht geeignet. Man konnte ihn als Positivkontrolle für eine Primärstoffwechsel-CAO verwenden.

3.9.2. Homospermidin

Zur Identifizierung einer CAO aus *S. vernalis* und *E. cannabinum*, die an der Biosynthese der PAs durch Umsetzung von Homospermidin beteiligt ist, war es erforderlich, Homospermidin herzustellen (siehe Einleitung - Abbildung 2). Dabei wurde Homospermidin durch eine enzymatische Umsetzung von Putrescin durch die rekombinante HSS aus *Rhodopseudomonas viridis* synthetisiert (siehe 2.15.2). Die von Harms [2000] beschriebene Reinigung wurde optimiert (siehe 2.15.2). Die bei der Trennung des nicht umgesetzten Putrescins vom Produkt Homospermidin mit Hilfe des sauren Kationenaustauschers Dowex-50 W X 8 angewendete Flussrate der Pumpe LKB-Pump P1 (Pharmacia) wurde von 0,7 ml/min auf 1 ml/min erhöht. Es wurde mit 1,4 M Salzsäure eine Elution des Putrescin gestartet. Nach Harms [2003] lässt sich Homospermidin von Putrescin durch Elution mit 1,4 M Salzsäure abtrennen. Nach 140 ml eluierte Putrescin weiterhin von der Säule. Erst nach Erhöhung der Salzsäurekonzentration auf 2,6 M konnte das Putrescin abgetrennt werden. Erst bei der Erhöhung der Salzsäurekonzentration auf 6 M wurde das gesamte Homospermidin von der Säule eluiert. Eine Prüfung der Fraktionen auf Reinheit des Homospermidins durch Dünnschichtchromatographie mit Ninhydrin-Sprühareagenz oder durch das RITA-System bei Reinigung von [^{14}C]Homospermidin erwies sich als notwendig (siehe 2.16.1.2), da das Elutionsprofil Schwankungen aufwies. Damit war nicht genau vorhersagbar, in welchen Fraktionen Homospermidin eluieren würde.

Die qualitative Analyse des synthetisierten Homospermidins erfolgte zusätzlich mit Hilfe der HPLC durch Vergleich der Retentionszeiten von benzylierten Polyamin-Standards (siehe 2.16.2). Die Quantifizierung des Homospermidins in den Elutionsfraktionen wurde durch Zusatz von Cadaverin als internen Standard zur Probe durchgeführt. Durch den unterschiedlichen Benzylierungsgrad musste

für die Berechnung des Homospermidingehaltes ein Korrekturfaktor von 1,4 berücksichtigt werden [Harms, 2003]. Die Gehaltsbestimmung an [^{14}C]Homospermidin erfolgte über Szintillationsmessung. Nach der Reinigung über die Ionenaustauschersäule betrug die Ausbeute an Homospermidin ca. 30-50% (theoretisch zu erwartende Menge an Homospermidin von der ursprünglich eingesetzten Menge an Putrescin).

3.10. Detektion von Chinonproteinen

Im aktiven Zentrum von CAOs befindet sich der aus Tyrosin durch posttranslationale Modifikation entstandene Cofaktor 2,4,5-Trihydroxyphenylalaninquinon (TPQ) (siehe Einleitung - 1.5). Chinonproteine können durch den Redoxfarbstoff Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) nachgewiesen werden. Im alkalischen pH-Bereich in Gegenwart von Glycin als Reduktionsmittel werden Chinone zum Hydrochinon oxidiert und der farblose Redoxfarbstoff zu einem schwarzblauen Produkt (Formazan) reduziert.

3.10.1. Nachweis von Chinonproteinen nach dem Blotten

Eine Möglichkeit Chinonproteine nachzuweisen, ist das Redoxstaining nach dem Blotten (siehe 2.12.15). Nach Expressionsversuchen vor und nach Dialyse das Chinonprotein nach TCA-Fällung im *E. coli*-Proteinextrakt (siehe 2.12.6 und 2.12.10) nachzuweisen, gelang nicht. Es war keine Blaufärbung auf der Blot-Membran sichtbar. Dies kann an einer nicht vollständigen Biogenese des TPQs aus Tyrosin gelegen haben. Bei FPLC-Proben, die eine Aktivität mit Homospermidin gezeigt hatten, war der Nachweis nach TCA-Fällung auf Chinonproteine positiv (siehe 3.2.5). Hier wurden Wurzelrohextrakte aufgereinigt und in diesen lag das CAO-Protein in seiner Form Chinonform vor.

3.10.2. Aktivitätsfärbung im nativen Gel

In Vorversuchen wurden umgepufferte Erbsenrohextrakte über 7,5% native Acrylamid-Trenngele aufgetrennt und eine Aktivitätsfärbung mit 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazolinsulfonsäure) (ABTS) durchgeführt (siehe 2.12.2 und 2.15.4). Die Chinonproteine waren als schwache blau-graue Bänder zu erkennen. Um die Intensität der Banden zu verstärken, wurde ein Kaliumphosphatpuffer getestet. Die Graufärbung der Chinonproteine war nach ABTS-Färbung schwächer als im HEPES-Puffer.

S. vernalis- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakte sowie die renaturierten rekombinanten SVAO1os-Proteine (siehe 3.2.2 und 3.7.1.2) zeigten keine Aktivitätsfärbung, auch nicht nach pH-Wert-Variation des HEPES-Puffers. Dies kann an einer geringeren CAO-Enzymaktivität der Asteraceen-CAOs, einer zu geringen CAO-Proteinkonzentration oder an einer nicht vollständigen Generation des TPQs bei den rekombinanten Proteinen gelegen haben.

3.11. Signalpeptid-Analyse

CAOs sind bei Leguminosen im Apoplast der Zellwand lokalisiert und spielen im Zusammenhang mit der Wasserstoffperoxidproduktion bei der Lignifizierung und Zellwandverfestigung eine Rolle [Federico und Angelini, 1986] sowie bei der Gefahrenabwehr bei Verwundung [Rea et al., 2002].

Für die Bestimmung des Zielortes eines Proteins ist eine Signalpeptidsequenz (20-80 Aminosäuren) von Proteinen verantwortlich, die mit dem Transportsystem der Zelle interagiert. Die am Ribosom hergestellten Proteine werden in die Subkompartimente, in denen das Protein seine Funktion ausübt, transportiert.

Mit Hilfe von Software-Programmen im Internet (siehe 2.10.14.2) wurden die drei SVAO-Aminosäuresequenzen (cDNA1, cDNA2 und cDNA3 aus *S. vernalis*, siehe 3.5) auf eine Signalpeptidsequenz und auf eine mögliche Lokalisation des Proteins in der Zelle untersucht (siehe 2.10.14.2). Die Ergebnisse waren nicht eindeutig, so dass die Lage der Proteine in den Zellkompartimenten durch ein Green-Fluorescent-Protein (GFP) nach Koprek et al. [1996; 2004a] und Nowak et al. [1996; 2004a] nachgewiesen werden sollte (siehe 2.11). Dazu wurde die Signalpeptidsequenz einschließlich der folgenden ca. 500 bp der drei SVAO-Sequenzen jeweils in den pBSK-GFP-N-Fus-Vektor (siehe Tabelle 4) kloniert (siehe 2.11.1). Dabei wurde an das 5'-Ende der Sequenz des GFPs die DNA-Sequenz fusioniert.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-Sig-cdna1for	5'-ATATAT <u>GGTCTCACATG</u> A GGA AAT ATT TTT GTG CTC AAT TCT TC-3'
	<i>Bsa</i> I-Schnittstelle T _m : 67,6°C SVAO1 Signalpeptid forward
SD-Sig-cdna1rev	5'-ATA <u>AGATCT</u> ATC ATG ATC TAT CAC AAG GCC CGC CT-3'
	<i>Bgl</i> II-Schnittstelle T _m : 68,3°C SVAO1 Signalpeptid reverse
SD-Sig-cdna2for	5'-ATATAT <u>GGTCTCACATG</u> G GAA AAT ATT TTT GTG TCC AAT TCT TAT-3'
	<i>Bsa</i> I-Schnittstelle T _m : 66,7°C SVAO2 Signalpeptid forward
SD-Sig-cdna2rev	5'-ATA <u>AGATCT</u> TGA CTT ATT AAA CTC CAA GTG CGA GTA-3'
	<i>Bgl</i> II-Schnittstelle T _m : 66,1°C SVAO2 Signalpeptid reverse
SD-Sig-cdna3for	5'- ATATTA <u>GGTCTCACATG</u> G ATG CAA GAA ATC TCA TCC GAT TTC-3'
	<i>Bsa</i> I-Schnittstelle T _m : 69,4°C SVAO3 Signalpeptid forward
SD-Sig-cdna3rev	TAA <u>AGATCT</u> AGT CAT AGT CGG GTA ACC AGA GTG TT-3'
	<i>Bgl</i> II-Schnittstelle T _m : 67,1°C SVAO3 Signalpeptid reverse

Tabelle 55: Genspezifische Primer für die Signalpeptidanalyse von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 (cDNA1, cDNA2 und cDNA3 aus *S. vernalis*). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, der zu *Nco*I-kompatible Überhang (CATG) ist doppelt unterstrichen und das Start-ATG ist fettgedruckt.

Es wurden genspezifische Primer für die drei Sequenzen entworfen (siehe Tabelle 55). Diese genspezifischen Forward-Primer besitzen eine *BsaI*-Schnittstelle, die auch das Start-ATG beinhaltet und die genspezifischen Reverse-Primer besitzen eine *BglII*-Schnittstelle.

Mit Hilfe der *Pfx*-DNA-Polymerase erfolgte eine PCR bei konstanter Annealing-Temperatur von 63°C für 35 Zyklen mit einem 50 µl-Ansatz (siehe 2.10.4.3). Nach Aufreinigung (siehe 2.10.9.1) wurden die drei PCR-Produkte jeweils erst mit *BsaI* und nach Inaktivierung mit *BglII* geschnitten (siehe 2.10.7). Parallel wurde der pBSK-GFP-N-Fus-Vektor erst mit *NcoI* und dann mit *BglII* geschnitten. Die *NcoI*-Schnittstelle des Vektors besitzt zur *BsaI*-Schnittstelle kompatible Überhänge, so dass eine Klonierung erfolgen kann. Anschließend wurde wie unter 2.11.2 beschrieben verfahren.

Die drei kontrollsequenzierten SVAO-Plasmide und der pBSK-GFP-N-Fus-Vektor wurden auf Goldpartikel aufgebracht und dann in *N. tabacum*- und *S. vernalis*-Blätter mit der Partikelkanone geschossen (siehe 2.11.3). Die Analyse der Signalpeptide erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop CLSM-510META Axioskop Mikroskop (Carl Zeiss) und der CLSM510 META Software (siehe 2.11.4). Die Anregung des GFPs erfolgte durch die Laserlinie 488 nm. Die Emission des Lichts wurde durch Filter geleitet und mit dem Photomultiplier detektiert. Die Chlorophyll-Autofluoreszenz in Pflanzenzellen wurde bei 665-719 nm aufgenommen, so dass das GFP eindeutig identifiziert werden konnte.

Die Fluoreszenz der Kontrolle (pBSK-GFP-N-Fus-Vektor) trat wie erwartet im Cytoplasma der Epidermiszellen von *S. vernalis* auf (Abbildung 52 Bild A). Bei allen drei SVAO-Konstrukten war die grüne Fluoreszenz des GFPs der Wellenlänge 510-515 nm in den Peroxisomen oder Mitochondrien messbar (Abbildung 52 Bild B-D). Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um eine genaue Differenzierung zwischen den Peroxisomen und den Mitochondrien zu treffen, da diese etwa die gleiche Größe (Länge ca. 0,5 µm) besitzen. Durch eine Co-Lokalisation mit einem Yellow-Fluorescent-Protein (YFP), das speziell zur Lokalisation von Peroxisomen geeignet ist, oder auch durch Lokalisation von Mitochondrien mit MitoTrackern könnten diese voneinander unterschieden werden [Bauer et al., 2004; Nowak et al., 2004b]. Die Mitochondrien und die Peroxisomen könnten isoliert und anschließend die CAO-Aktivität bestimmt werden.

CAOs katalysieren die oxidative Deaminierung von Aminen und dabei entsteht u. a. Wasserstoffperoxid (siehe Einleitung - 1.5). Die SVAO-Proteine werden wahrscheinlich in den Peroxisomen der Zellen lokalisiert sein. Peroxisomen enthalten große Mengen an Catalase und durch diese kann das toxische Wasserstoffperoxid abgebaut werden kann.

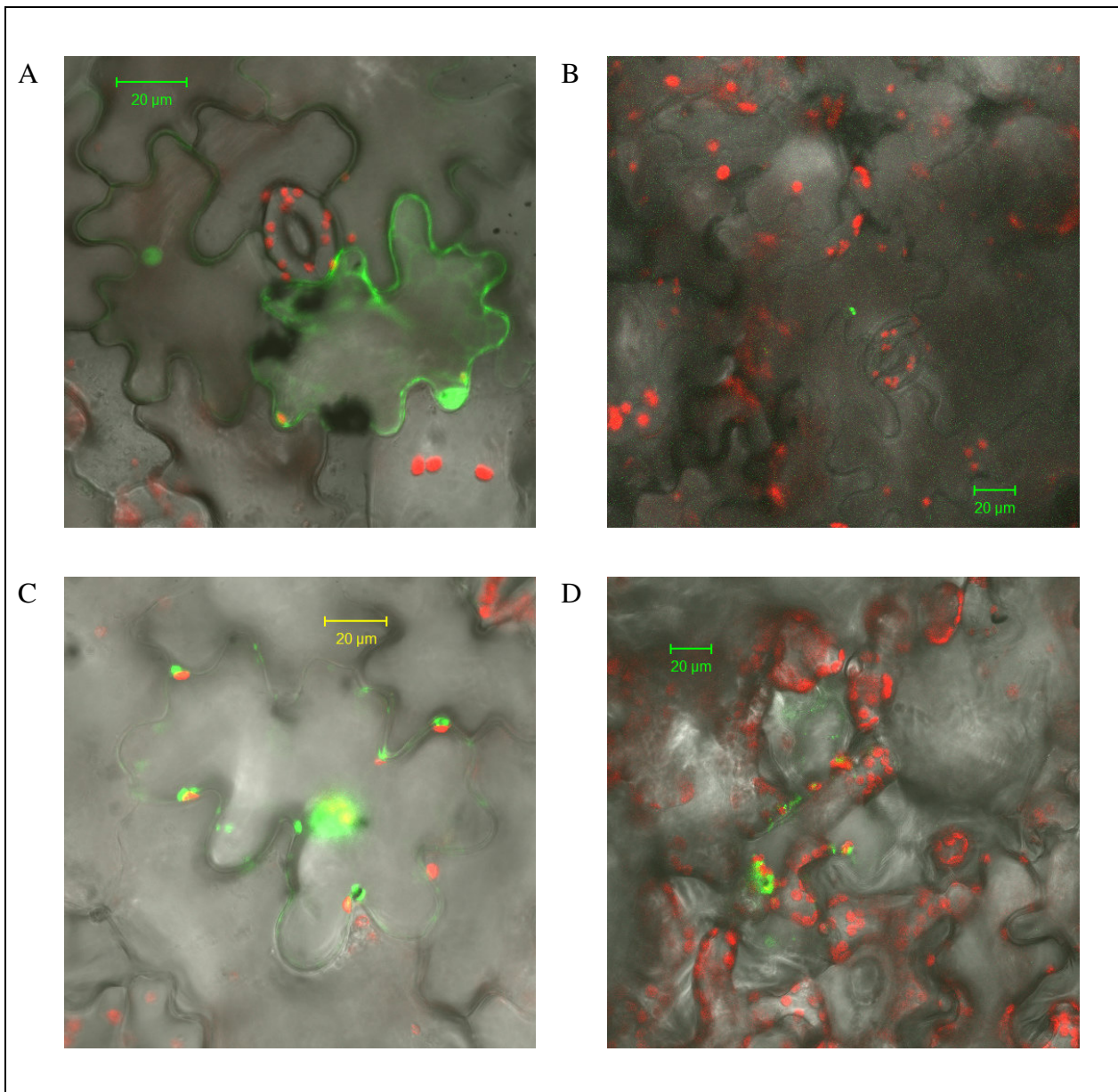


Abbildung 52: Signalpeptidanalyse von SVAO1, SVAO2 und SVAO3 (cDNA1, cDNA2 und cDNA3 aus *S. vernalis*) mit Hilfe von transformierten *N. tabacum*- und *S. vernalis*-Blättern – Aufsicht auf die untere Epidermis durch das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop CLSM-510META Axioskop Mikroskop und einem Argonlaser (Anregung bei 488 nm) (40x und 20x Objektive, Filtersatz BP 540-490/LP 520).

Das Green-Fluorescent-Protein (GFP) wird durch grüne Fluoreszenz und Chloroplasten werden durch rote Autofluoreszenz sichtbar. Teilweise befindet sich die grüne Fluoreszenz des GFPs um den Zellkern lokalisiert. Dort findet an den Ribosomen die Proteinbiosynthese verstärkt statt, da das raue ER den Zellkern umschließt.

- A) Kontrollvektor pBSK-GFP-N-Fus in einem *S. vernalis*-Blatt (Lokalisation: Cytosol)
 B) SVAO1 in einem *S. vernalis*-Blatt (Lokalisation: Peroxisom oder Mitochondrien)
 C) SVAO2 in einem *N. tabacum*-Blatt (Lokalisation: Peroxisom oder Mitochondrien)
 D) SVAO3 in einem *N. tabacum*-Blatt (Lokalisation: Peroxisom oder Mitochondrien)

3.12. Weitere Strategien zur Identifizierung von Enzymen der PA-Biosynthese

3.12.1. Untersuchung der HSS-Expression in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium

Durch eine „Suppression subtractive hybridization – Differentielle PCR“ können cDNA-Bibliotheken hergestellt werden. Diese Methode kann zur Anreicherung von seltenen cDNA-Sequenzen dienen, die in einer Population exprimiert werden, nicht aber in einer anderen. Es wird dazu Gesamt-RNA aus diesen zwei unterschiedlichen Populationen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Anschließend wird eine Hybridisierung der beiden Proben durchgeführt. Übrig bleiben Sequenzen, die ausschließlich in nur einer Population vorhanden sind [Diatchenko et al., 1996].

Durch eine „differentielle PCR“ sollten cDNAs, die für Enzyme der PA-Biosynthese codieren, angereichert werden. Es war notwendig dafür Proben zu gewinnen, in denen einmal die HSS-Expression vorhanden war und andere, in denen diese abgeschaltet war. Es wurde angenommen, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die HSS-Expression nachweisbar ist, auch die übrigen Enzyme der PA-Biosynthese in den Zellen vorhanden sind. Es wurden *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Pflanzen untersucht.

Es wurden die Wurzeln von *S. vernalis*-Pflanzen, die auf der Fensterbank angezogen wurden, zu vier verschiedenen Zeitpunkten geerntet: Rosetten-, Knospen-, Blüten- und Fruchtbildung. Anschließend erfolgten Western-Blots mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS von *S. vernalis* (siehe 2.12.14).

Die Western-Blot-Analysen von *S. vernalis*-Pflanzen zeigten keine Abhängigkeit der HSS-Expression vom Entwicklungszustand (siehe Abbildung 53).

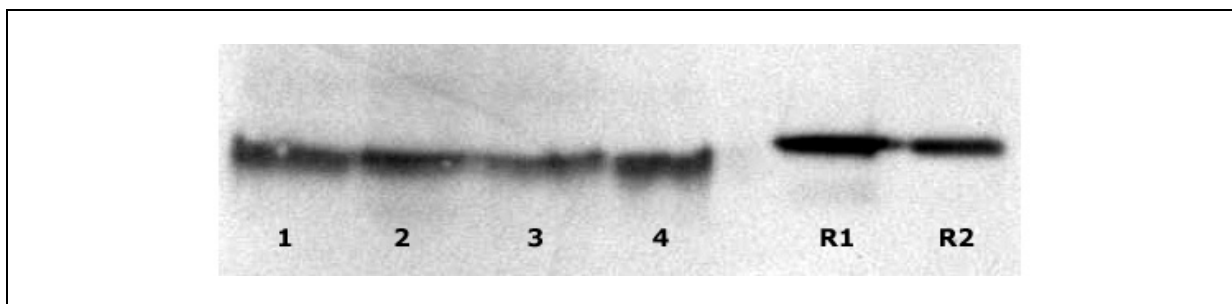


Abbildung 53: HSS-Expression von *S. vernalis*-Pflanzen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Topfpflanze in Fensterbank gezogen); Der Western-Blot erfolgte mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die HSS von *S. vernalis*. Es wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen und die Blot-Membran für 45 sec belichtet.

Stadium 1. Rosette 2. Knospe 3. Blüte 4. Frucht

R1. Referenz 200 ng HSS-Protein mit His-Tag von *S. vernalis*

R2. Referenz 100 ng HSS-Protein mit His-Tag von *S. vernalis*

Bei der einjährigen *S. vernalis*-Pflanze war die HSS-Expression zu allen Wachstumsstadien gleich stark ausgeprägt und damit eignete sich diese Pflanze nicht für eine „Differenzielle PCR“. Zusätzlich liegt bei *S. vernalis* die Schwierigkeit vor, dass die HSS-Expression auf sehr wenige Zellen beschränkt

ist. Sie kommt in einigen Endodermiszellen und den angrenzenden Rindenparenchymzellen vor [Moll et al., 2002].

Bei den Wurzeln der mehrjährigen Staude *E. cannabinum* haben immunologische Messungen gezeigt, dass die HSS-Expression in den gesamten Zellen des Rindenparenchym der Wurzel lokalisiert und im Knospenstadium maximal ist [Anke et al., 2004]. Anschließend wird sie langsam abgeschaltet wird. Zum Zeitpunkt der Fruchtbildung war zu keine Expression messen [Anke et al., 2004]. Deshalb wurden die jungen, weißen Wurzeln von *E. cannabinum* aus einem Beet im Arzneipflanzengarten zu mehreren Zeitpunkten geerntet und anschließend wurde die HSS-Expression mittels affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS von *E. cannabinum* durch Western-Blot analysiert (siehe 2.12.14). So sollten Proben für eine „differentielle PCR“ gewonnen werden, bei denen die HSS-Expression eingeschaltet (Knospen- bis Blütenstadium) ist und andere, in denen die HSS-Expression abgeschaltet ist (Frucht-Bildung).

Hier zeigte sich bis zum 16. August (siehe Abbildung 54) ein vergleichbares Verhalten wie S. Anke et al. [2004] es für *E. cannabinum* beobachtet hatte. Ab dem 23. August wurde die HSS-Expression langsam wieder angeschaltet. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass zu diesem Zeitpunkt aus dem Beet die Blüten von einigen *E. cannabinum*-Nachbarpflanzen geerntet wurden und im August sowie im September noch recht warme Temperaturen zu messen waren, so dass diese Pflanzen neue Knospen und neues Wachstum entwickelten.

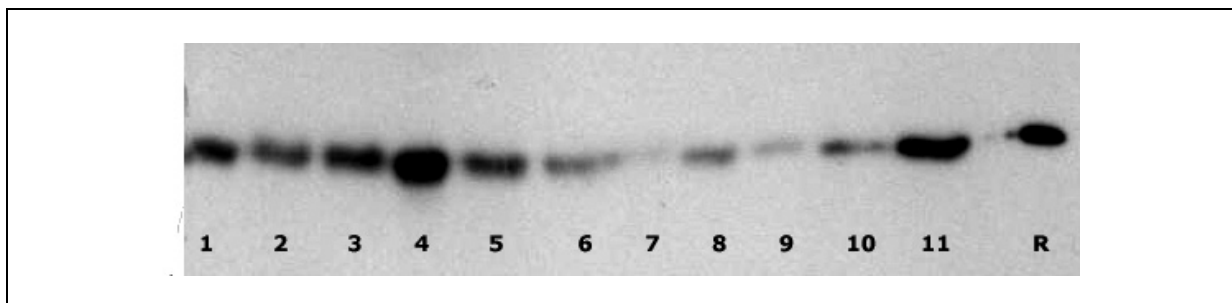


Abbildung 54: HSS-Expression von *E. cannabinum*-Pflanzen (Gartenbeet) zu verschiedenen Zeitpunkten im Jahr geerntet. Der Western-Blot erfolgte mit affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS von *E. cannabinum*. Es wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen und die Membran für 45 sec belichtet.

Datum	Stadium	Datum	Stadium
1. 7. Juni	Knospe	7. 16. August	Blüte, Frucht
2. 23. Juni	Knospe	8. 23. August	Frucht
3. 7. Juli	Knospe	9. 30. August	Frucht, Blüte
4. 26. Juli	Blüte, Knospe	10. 9. September	Frucht
5. 2. August	Blüte, Knospe	11. 17. September	Frucht
6. 6. August	Blüte	R. 200 ng HSS-Protein mit His-Tag	

Die vorherrschende Morphologie wird als erstes in der Tabelle genannt.

3.12.2. Variationen der Gewebeeinbettungen für Laser-Capture-Microscopy (LCM)

Die Laser-Capture-Microdissection (LCM) ist eine „Single Cell“-Technik, mit der kleine Flächen bzw. einzelne Zellen aus einem Gewebe isoliert werden können. Dabei werden die Zellen unter einem Mikroskop beobachtet. Die Zellen werden mit einem Laserstrahl ausgeschnitten und anschließend je nach Gerät entweder an einem Plastikfilm gebunden oder durch einen Laserstrahl in ein Gefäß katapultiert [Cornea und Mungenast, 2002; Kerk et al., 2003]. Anschließend wird im Mikromaßstab (2000-5000 Zellen) die Gesamt-RNA aus diesen Zellen isoliert und in cDNA durch eine Reverse-Transkription umgeschrieben, so dass cDNA-Banken erstellt werden können. Für eine LCM mussten die Pflanzengewebe in Paraffin eingebettet werden.

3.12.2.1. Wahl des *S. vernalis*-Pflanzenmaterials

Die Expression der cytosolischen HSS von *S. vernalis* ist auf eine Gruppe von Endodermiszellen und den angrenzenden Rindenparenchymzellen in direkter Nachbarschaft zu den Phloemzellen begrenzt [Moll et al., 2002]. Die Hypothese war, dass die gesamten Enzyme der PA-Biosynthese in diesen spezifischen Zellen der Wurzel lokalisiert sind.

Um den optimalen Zeitpunkt und die optimalen morphologischen Bedingungen für eine LCM zu bestimmen, wurde die HSS-Expression in Wurzeln von *S. vernalis* und *Senecio jacobaeae* mit Hilfe Immunolokalisation analysiert (siehe 2.13.1.5). Da Wurzelorgankulturen von *S. jacobaea* einen für die Paraffineinbettung geeigneteren Wurzelbau besitzen, sollte die HSS-Expression in *S. jacobaea* lokalisiert werden. Die Zellen der Wurzelorgankulturen von *S. jacobaea* sind fest miteinander verbunden. Das *S. vernalis*-Wurzelgewebe ist dünnwandig und locker. Zu diesem Zeitpunkt lag noch kein Antikörper gegen die HSS von *S. jacobaea* vor, so dass mit dem affinitätsgereinigten HSS-Antikörper von *S. vernalis* gearbeitet wurde. Aber auch mit einer 1/5 Verdünnung des HSS-Antikörpers von *S. vernalis* liess sich keine Fluoreszenzmarkierung in den Wurzelorgankulturen (14 Tage alt) nachweisen. Deshalb wurden 14 Tage alte Wurzelorgankulturen und in Erde gewachsene Wurzeln von *S. vernalis* (Rosettenstadium) in Technovit 7100 eingebettet (siehe 2.13.1) und anschließend mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die HSS von *S. vernalis* markiert. Die Fluoreszenzmarkierung des Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die FITC-Markierung war bei der zwölf Tage alten Wurzelorgankultur, die ein diarches Leitbündel besaß, in den Endodermiszellen in direkter Nachbarschaft zum Phloem zu finden (Abbildung 55 A). Die Zellen der WOK waren sehr dünnwandig und locker im Gewebeverband verteilt, so dass sie sich nicht für die LCM eigneten.

Die alte, in Erde gewachsene *S. vernalis*-Wurzel (Rosettenstadium) befand sich im sekundären Dickenwachstum und besaß ein triarches Leitbündel (Abbildung 55 B). Aber auch hier war die HSS-Expression auf die Endodermiszellen mit den angrenzenden Rindenparenchymzellen neben dem primären Phloem/Bast beschränkt. Die Zellen lagen leicht deformiert vor. Für die weiteren

Einbettungen war es wichtig, junge in Erde gewachsene Wurzeln nach Moll et al. [2002] zu verwenden, bei denen das sekundäre Dickenwachstum noch nicht eingesetzt hat und das triarche Leitbündel gut zu erkennen ist (Abbildung 55 C).

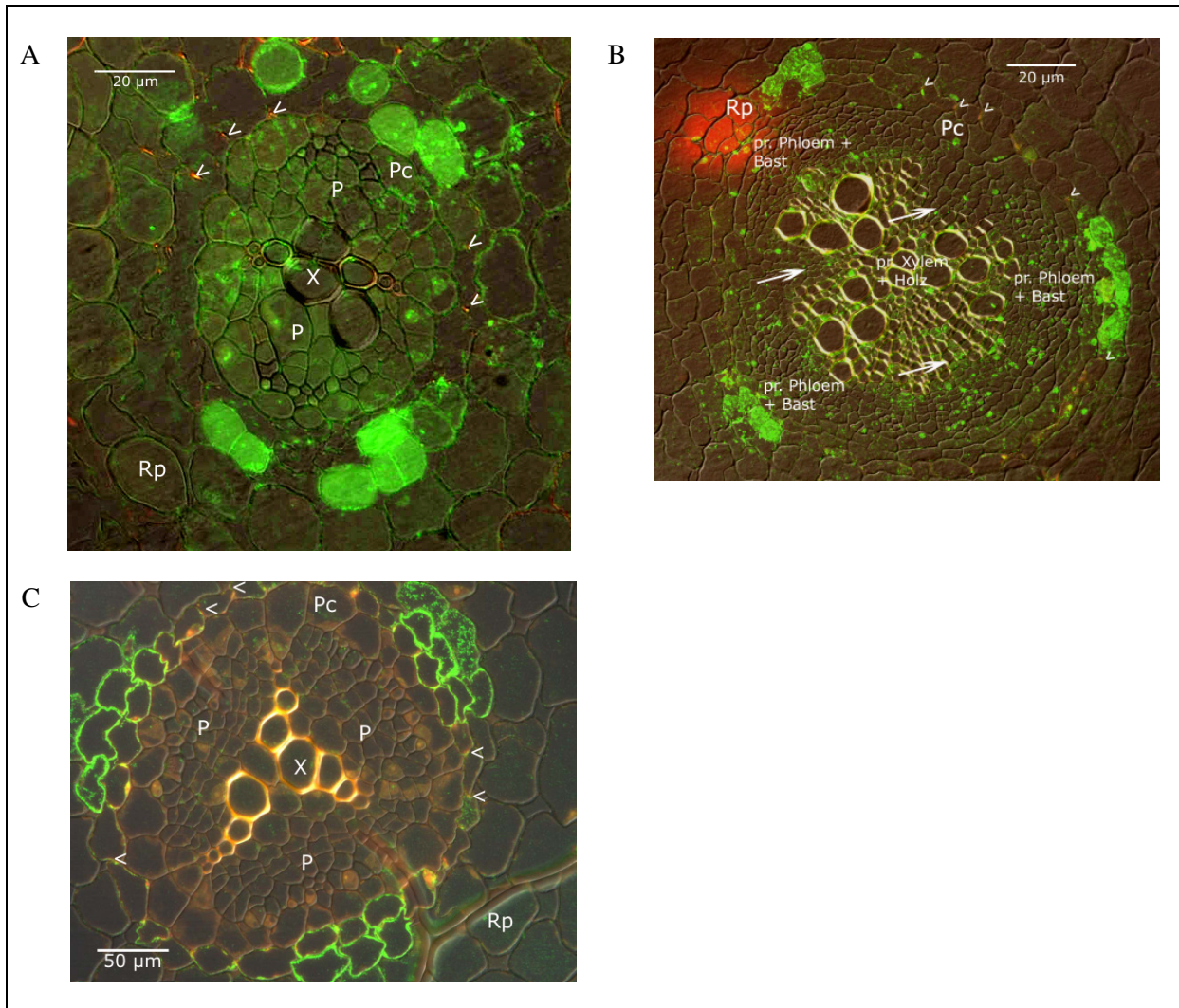


Abbildung 55: Immunolokalisation der HSS in Wurzelquerschnitten von *S. vernalis* (siehe 2.13.1.5).

Die FITC-Detektion von HSS-exprimierenden Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms erfolgte mit dem affinitätsgereinigten HSS-Antikörper (Schnittdicke 4 µm).

Rp Rindenparenchym **P** Phloem **X** Xylem **Pc** Perizykel **<** Casparische Streifen der Endodermis

Bild A: Wurzelorgankultur (14 Tage alt) mit diarchem Leitbündel – 8 bis 10 Zellen der Endodermis und des Rindenparenchyms sind markiert.

Bild B: ältere Wurzel in Erde (Rosettenstadium) gewachsen mit triarchem Leitbündel und nach Einsetzen des sekundären Dickenwachstums (große Pfeile markieren beginnende Markstrahlen) – FITC-Markierung von Endodermis- und Rindenparenchymzellen in Nachbarschaft zum primären Phloem/Bast.

Bild C: junge Wurzel in Erde gewachsen mit triarchem Leitbündel – Markierung von je 3-4 Endodermiszellen sowie 3-4 Nachbarrindenparenchymzellen zum angrenzenden Phloem [Moll et al., 2002].

3.12.2.2. Paraffin-Einbettung

Für die LCM-Technik musste die *S. vernalis*-Wurzel in Paraffin eingebettet werden, da anschließend aus den ausgeschnittenen Zellen intakte Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden

sollte. Da kaum Erfahrungen zu dieser Einbettungstechnik im Institut vorlagen, musste eine Methode etabliert werden (siehe 2.13.2).

Für die Einbettung in Paraffin mussten die Pflanzengewebe als erstes mit einer Fixierlösung zur Fixierung der Zellinhalte und der Antigene behandelt werden (siehe 2.13.2.1). Zur Fixierung der Wurzeln wurden verschiedene Fixierlösungen, wie Formaldehyd, Ethanol mit Eisessig und ein Formalin-Essigsäure-Ethanol-Gemisch getestet. Die Entwässerung des Wurzelgewebes fand durch eine Ethanolreihe statt, die zwischen 30 Minuten und 3 Stunden variierte. Die Infiltration der Wurzel erfolgte mit Xylol und den Xylolersatzmitteln (n-Propanol, t-Butanol, n-Butanol, Ultraclear, Roticlear, Rotihistol, Isopropanol). Die Infiltrationszeit betrug ebenfalls zwischen 30 min und 3 Stunden. Nach Romeis [1989] härten Xylol, Toluol und Benzol die Gewebe und machen sie spröde und splitterig. Bei pflanzlichen Objekten scheinen Butanol und Isopropanol besser geeignet zu sein. Zur Einbettung wurden Paraplast® X-tra (Roth) und Paraffin verwendet. Dabei zeigte sich Paraplast® X-tra (Roth) einfacher in der Handhabung (siehe 2.13.2). Das Einbettungsergebnis war immer das gleiche: Die Gewebeschnitte wurden bei einer Schnittdicke $< 20 \mu\text{m}$ zerrissen, wobei die Gewebe des Zentralzylinders aus dem Gewebeverband herausgelöst wurden. Die Schnitte $> 20 \mu\text{m}$ waren nicht reproduzierbar intakt vorhanden. Die verholzten Gewebe der Wurzeln waren schwer zu infiltrieren.

Um eventuelle Fehler bei dem Einbettungsverfahren aufzuklären, wurde Kontakt zu der Arbeitsgruppe von Dr. Julia Kehr des MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm aufgenommen (siehe 2.13.2). Diese besitzt ein LCM und bettet Blätter von *Arabidopsis thaliana* für die „Single-Cell-Technik“ in Paraplast ein. Trotz der neu erlernten Techniken und Geräte konnten keine verbesserten Wurzelquerschnitte erreicht werden. Die *A. thaliana*-Blatt-Einbettung war nicht vollständig auf die *S. vernalis*-Wurzeln optimiert.

3.12.2.3. RNA-Isolierung

Für die Erstellung von cDNA-Banken war es wichtig, dass die Gesamt-RNA bei der Einbettung in Paraplast® X-TRA nicht degradiert wurde. Entscheidend hierfür waren kurze Einbettungszeiten und niedrige Einbettungstemperaturen (siehe 3.12.2.2).

Es musste eine Methode entwickelt werden, durch die aus geringen Mengen Pflanzenzellen nach Paraplast® X-TRA-Einbettung Gesamt-RNA guter Qualität isoliert werden konnte. Auch war es notwendig auf diese Art zu überprüfen, dass kein Abbau an RNA während der Einbettungsprozedur stattgefunden hat, so dass später eine LCM mit dem Material durchgeführt werden kann.

Gesamt-RNA wurde auf drei verschiedene Methoden aus den eingebetteten Geweben isoliert (siehe 2.10.1). Am besten geeignet war die Trizol-Methode, da das Paraplast® X-TRA in diesem Lösungsmittelgemisch gut löslich war.

Ob ein Abbau an Gesamt-RNA erfolgt war, wurde durch eine PCR überprüft. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe 2.10.3) und anschließend wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase und den Expressionsprimern für die SVAO1 (cDNA1 aus *S. vernalis*) (siehe Tabelle 56)

eine Standard-PCR mit einer Annealing-Temperatur von 66°C für 35 Zyklen durchgeführt (siehe 2.10.4.1). Es wurde kein Amplifikat erhalten.

Oligo-Peptid	Sequenz
SD-ExpSVfor1-28gen1	5'-ATA CTGCAG ATG AGG AAA TAT TTT TGT GCT CAA TTC TTC-3'
	Expressionsprimer forward T_m : 66,3°C
SD-ExpSVrev1-28gen1	5'-ATA TGC GGC CGC ATA AGA GCG AGC CAC GGA ACA CAC G-3'
	Expressionsprimer reverse T_m : >75°C
D4-3Race2for	5'-AAC AGA CTC TAT CG AGA CAT GTT-3'
	3'RACE T_m : 57,1°C <i>Senecio vernalis</i> HSS KlonA
ExpKlonA-for	5'-TAT ATC ATA TGG CCG AGT CAA ACA AAG AAG-3'
	Expressionsprimer forward T_m : 62,7°C <i>Senecio vernalis</i> HSS KlonA
ExpKlonA-rev	5'-TTA CCT GAT CAA AAA CCA TTG ACT TTA GAT GC-3'
	Expressionsprimer reverse T_m : 63,1°C <i>Senecio vernalis</i> HSS KlonA

Tabelle 56: Genspezifische Expressionsprimer für die SVAO1 (cDNA1 mit Signalpeptidsequenz aus *S. vernalis*) und genspezifische Primer für die Homospermidinsynthase (HSS) von *S. vernalis*.

Durch die Einbettungsprozedur könnte die RNA teilweise degradiert sein, so dass es eher unwahrscheinlich war, dass ein 2000 bp großer RNA-Abschnitt vollständig erhalten geblieben war. Deshalb wurde mit der hergestellten cDNA eine Standard-PCR mit einem 3'RACE-Primer in Kombination mit dem Oligo-dT-Primer und den Expressionsprimern der HSS (nur ca. 1100 bp) von *S. vernalis* (siehe Tabelle 6 und Tabelle 56) durchgeführt (siehe 2.10.4.1). Aber auch auf diese Weise wurde kein PCR-Produkt erzeugt.

Es stellte sich die Frage, ob die Einbettungsmethode für Degradation der RNA verantwortlich war oder, ob andere Methoden für die RNA-Isolierung im Mikromassstab (z. B. Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Dyna) oder PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus)) angewendet werden müssen. Diese Kits wurden speziell für die RNA-Isolierung im Mikromassstab entwickelt. In dieser Arbeit kamen nur Methoden für eine RNA-Isolierung im Makromassstab zum Einsatz.

4. Diskussion

4.1. Biosynthesewege

Die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese wurde mit radioaktiv markierten Vorstufen an *Senecio*-Arten (Asteraceen) größtenteils durch Hemmstoffversuche aufgeklärt. Die Verbindungen Ornithin, Arginin, Putrescin, Spermidin und Spermin werden in die Necinbase bzw. Pyrrolizidin-Alkaloide eingebaut (siehe Abbildung 56). Ornithin wird über Arginin und Agmatin zu Putrescin umgewandelt [Hartmann et al., 1988]. Dieses Diamin reagiert mit Spermidin in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion zum Homospermidin [Khan und Robins, 1981a; Robins und Sweeney, 1981; Böttcher et al., 1993]. Homospermidin wird in Retronecin ohne Abbau umgewandelt [Khan und Robins, 1985]. Bei der Untersuchung der Biosynthese in Boraginaceen wurde ein unbekanntes Zwischenprodukt „Verbindung X“ durch Frölich et al. [1996, 2007] bei Fütterungsversuchen mit Polyaminen und Aminen nachgewiesen. Dieses konnte bis heute nicht eindeutig identifiziert werden. Es könnte sich um das Iminiumion oder eine andere polare Verbindung handeln.

Die Enzyme, die für die Bildung der Necinbase in der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese verantwortlichen sind, wurden bis zur Homospermidinsynthase (HSS EC 2.5.1.45) aufgeklärt (siehe Abbildung 56). Durch Voruntersuchungen wurde eine „Diaminoxidase“ als Nachfolgeenzym zur Bildung des Iminiumions vorgeschlagen. Diese soll Homospermidin an der primären Aminogruppe zur Aldehydgruppe oxidieren [Robins, 1982; Kelly und Robins, 1988].

Im Primärstoffwechsel der Pflanzen katalysieren kupferhaltige Aminoxygenasen (CAOs) die Oxidation der primären Aminogruppe von Polyaminen zum Aldehyd unter Verbrauch von Sauerstoff. Putrescin wird unter Zyklisierung des Aminobutanals zum 1-Pyrrolin [Cona et al., 2006]. Polyaminoxidasen (PAOs) spalten Polyamine unter Sauerstoffverbrauch an einer sekundären Aminogruppe zu einem Aldehyd und einem Diamin [Cona et al., 2006]. Spermidin wird durch PAOs zu Diaminopropan und Aminobutanal oxidiert. Das Letztere zyklisiert spontan unter Bildung von 1-Pyrrolin. Da nachgewiesen wurde, dass das gesamte Homospermidinmolekül die Vorstufe für den Necinbase-Grundkörper bildet, wurde eine Oxidation durch eine PAO bei der Zyklisierung zum Iminiumion ausgeschlossen.

Im Sekundärstoffwechsel der Pflanzen oxidieren CAOs Amine, die bei der Bildung von Sekundärstoffen beteiligt sind. Nach der Oxidation der primären Aminogruppe zur Aldehydgruppe erfolgt ein spontaner Ringschluss. Dazu gehören die Tropanalkaloid-, die Nicotin- und die Benzyloisochinolinalkaloid-Biosynthese [Mizusaki et al., 1972; Hashimoto et al., 1989a, b; Hashimoto et al., 1990; Walton und McLauchlan, 1990; McLauchlan et al., 1993; Hashimoto und Yamada, 1994; Podobová et al., 1994; Bilková et al., 2005; Heim und Jelesko, 2004; Heim et al., 2007].

Homospermidin wird auch durch eine Rinderplasma-Aminoxygenase, einer kupferhaltigen Säugetieraminoxidase, an der primären Aminogruppe oxidiert. Hier entsteht bei der Oxidation der Dialdehyd und das 1-(3-Aminobutyl)pyrrolinium [Lee und Sayre, 1998; Houen et al., 2005], das eine Vorstufe des Necinbase-Grundkörpers ist.

Zur Aufklärung der Necinbase-Grundkörpersynthese wurden Wurzelrohextrakte und durch FPLC angereinigte Homospermidin-umsetzende Enzyme aus Wurzelrohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit [^{14}C]Homospermidin als Substrat inkubiert. Die Umsätze wurden durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. In Rohextrakten sind eine Vielzahl von Enzymen enthalten, so dass die gemessenen Umsätze durch eine Vielzahl von enzymatischen Reaktionen entstanden sein können. Es sind neben CAOs auch Polyaminoxidasen (PAOs) in einem Rohextrakt enthalten.

Nach einer FPLC-Anreinigung mit der Hydroxylapatit- und auch bei der DEAE-Fractogel-Säule wurden bei den Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus *S. vernalis*- und *E. cannabinum*-Wurzelrohextrakten jeweils zwei Hauptprodukte gemessen. Keiner der mit dem Radio-Assay gemessenen Peaks konnte eindeutig als Necinbase-Grundkörper über Standards identifiziert werden. Alle Umsätze müssen durch eine PAO bzw. eine CAO entstanden sein, da sie durch den CAO- und PAO-Hemmstoff HEH hemmbar waren. In Pflanzen oxidieren PAOs Polyamine an der sekundären Aminogruppe. Homospermidin würde durch eine PAO zu Putrescin und 1-Pyrrolin oxidiert werden. Putrescin konnte nicht nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Chromatogramme einer *P. sativum*-Inkubation mit [^{14}C]Putrescin als Substrat mit den Chromatogrammen der PA-Pflanzen-Inkubationen mit [^{14}C]Homospermidin als Substrat konnte die Bildung von 1-Pyrrolin ausgeschlossen werden. Deshalb konnte keine Spaltung durch eine PAO an der sekundären Aminogruppe erfolgt sein. Ein Produkt (R_f -Wert 0,40 im Polyamin-Fließmittel) wurde bei beiden PA-Pflanzen gebildet. Homospermidin könnte an der primären Aminogruppe durch eine CAO zum Aldehyd oxidiert worden sein. Auch könnte in einer nachfolgenden Reaktion die im Inkubationsansatz enthaltene Alkoholdehydrogenase den entstandenen Aldehyd zum Alkohol reduziert haben.

Durch ein Redox-Staining mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) konnte ein Chinonprotein in den „aktiven“ Fraktionen der FPLC-Anreinigungen nachgewiesen werden. Das Produkt (R_f -Wert 0,40 im Polyamin-Fließmittel) ist möglicherweise durch ein Chinonprotein entstanden.

In den molekularbiologischen Untersuchungen sind in den Wurzeln drei verschiedene CAO-homologe Sequenzen aus *S. vernalis* identifiziert worden, so dass auch mehrere CAOs an den bei den Inkubationen gemessenen Umsätzen beteiligt sein können.

Die SVAO1 (cDNA1 aus *S. vernalis*) scheint ein Primärstoffwechselenzym zu sein, das die Umsetzung ④ (siehe Abbildung 56) von Putrescin zu 1-Pyrrolin katalysiert. Nach einer Renaturierung der SVAO1-Inclusion-bodies wurde nur mit [^{14}C]Putrescin als Substrat ein Umsatz nachgewiesen. Im Primärstoffwechsel der Pflanzen katalysiert die Desoxyhypusinsynthase (DHS, EC 2.5.1.46) (siehe Einleitung - 1.3) in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion die Übertragung einer Aminobutyl-Einheit des Spermidins auf einen spezifischen Lysin-Rest eines eIF-5A-Vorläuferproteins. Als Nebenaktivität besitzt sie die Fähigkeit, Putrescin als Aminobutylrezeptor zu verwenden und Homospermidin zu bilden. Eine solche Nebenaktivität ② (siehe Abbildung 56) der Oxidation von Homospermidin zum Aldehyd durch die SVAO1 kann noch nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Assaybedingungen

noch weiter optimiert werden müssen. Die Identifizierung der Funktion der beiden anderen Sequenzen aus *S. vernalis* und der Sequenz aus *E. cannabinum* ist bis jetzt noch nicht geklärt.

①	Arginin-Decarboxylase (EC 4.1.1.19)
②	Agmatin-Iminohydrolase (EC 3.5.3.12)
③	<i>N</i> -Carbamoylputrescin-Amidohydrolase (EC 3.5.1.53)
④	kupferhaltige Aminoxydase (EC 1.4.3.6) - Primärstoffwechselenzym, HEH-hemmbarer Reaktion, Lokalisation in der Zellwand und wahrscheinlich im Peroxisom (CAO)
⑤	γ -Aminobutylaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.19)
⑥	γ -Aminobuttersäure-Transaminase (EC 2.6.1.19)
⑦	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.24)
⑧	Spermidin-Synthase (EC 2.5.1.16)
⑨	Putrescinproduzierendes Enzym, nicht HEH-hemmbarer Reaktion
⑩	Polyaminoxidase (EC 1.5.3.11), HEH-hemmbarer Reaktion (PAO)
❶	Homospermidinsynthase (EC 2.5.1.45), NAD^+ -abhängige Reaktion (HSS)
❷	kupferhaltige Aminoxydase (EC 1.4.3.6) - Sekundärstoffwechselenzym, HEH-hemmbarer Reaktion, Lokalisation wahrscheinlich im Peroxisom (CAO)

Tabelle 57: Legende zur Abbildung 56 (nächste Seite)

①②③ [Hartmann et al., 1988] ⑧ ⑨ [Graser und Hartmann, 1997, 2000] ⑩ [Adolph, 1991] ❶ [Böttcher et al., 1993]

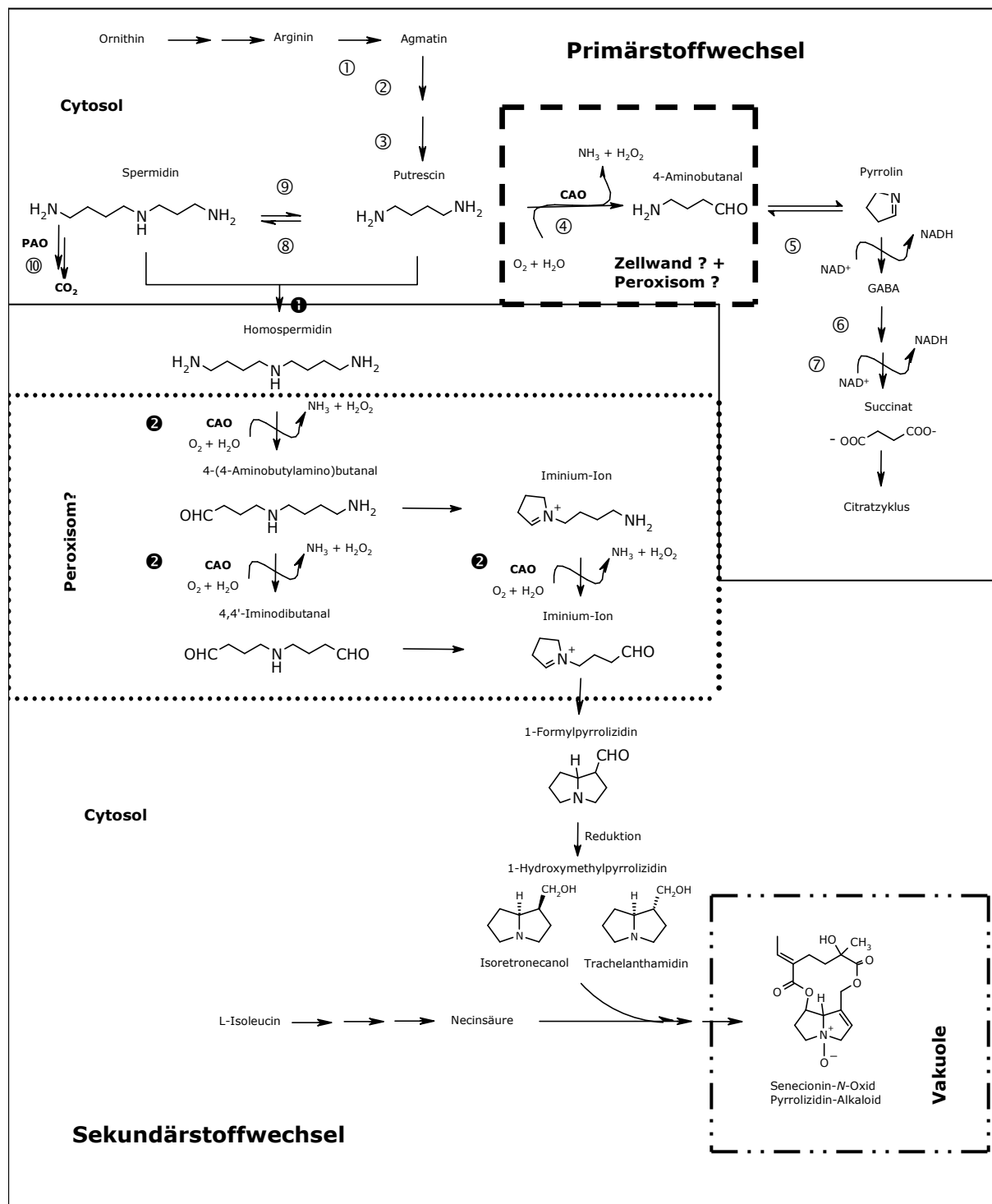


Abbildung 56: Vereinfachte Darstellung der Reaktionen des Primärstoffwechsels und des Sekundärstoffwechsels in *S. vernalis*, die an der PA-Biosynthese beteiligt sind, und mögliche Lokalisation der SVAOs (nach den bisher gewonnen Ergebnissen).

4.2. Gewebespezifische Expression der drei SVAO-Sequenzen

Durch Fütterungsversuche mit [^{14}C]radioaktivmarkierten Vorstufen wie Arginin, Putrescin und Spermidin von Kallus- und Zellsuspensionskulturen wurde festgestellt, dass in den Wurzeln der Asteraceen die Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese bis zum PA-*N*-Oxid vollständig abläuft [Hartmann et al., 1989]. Homospermidin wird aus Putrescin und Spermidin durch die Homospermidinsynthase (HSS) gebildet [Böttcher et al., 1993; Böttcher et al., 1994] (siehe ❶ in Abbildung 56). Die Homospermidinsynthase ist das erste spezifische Enzym in der PA-Biosynthese, das den Primärstoffwechsel mit dem Sekundärstoffwechsel verknüpft. Es wird postuliert, dass es sich bei dem Homospermidin-umsetzenden Enzym ❷ um eine kupferhaltige Aminoxidase (CAO) handelt (siehe Einleitung - 1.3).

Expressionsanalysen mit der mehrjährigen PA-Pflanze *E. cannabinum* (Asteraceae) haben gezeigt, dass die HSS-Transkription ausschließlich in den jungen, neu gebildeten, weißen Wurzeln erfolgt. In allen anderen Geweben der Pflanze findet keine Transkription statt. Dieses Ergebnis wurde durch Western-Blot-Analyse bestätigt [Anke et al., 2004]. Der Ort der HSS-Expression in der Wurzel von *E. cannabinum* ist das Rindenparenchym [Anke et al., 2004]. Nach Moll et al. [2002] ist die HSS-Expression in der Wurzel der einjährigen PA-Pflanze *S. vernalis* (Asteraceae) auf wenige Zellen der Endodermis und des Rindenparenchym, die gegenüber dem Phloem liegen, begrenzt. Bei *S. vernalis* zeigte sich bei den hier durchgeführten Western-Blot-Analysen, dass die HSS-Expression während der gesamten Entwicklung der Pflanze gleich stark ausgeprägt ist. Bei *E. cannabinum* steht die HSS-Expression mit dem Pflanzenwachstum und somit mit der Proteinbiosynthese in Beziehung. Während des Wachstums der Pflanze steigt die HSS-Expression an und bei Samenbildung wird sie abgeschaltet [Anke et al., 2004]. Ein Einfluss der Umgebung der Pflanzen auf die HSS-Expression wurde durch die in dieser Arbeit durchgeführte Western-Blot-Analyse gezeigt. Knospenbildung und neues Wachstum der *E. cannabinum*-Nachbarpflanzen induzierten eine erneute HSS-Expression in den untersuchten *E. cannabinum*-Pflanzen, obwohl diese Pflanzen schon anfangen, Früchte zu bilden.

Bei der PA-Pflanze *Heliotropium indicum* (Boraginaceae) erfolgt die Transkription der HSS in allen Organen der Pflanze (jungen Wurzeln (schwach), Spross, Blättern, Knospen und Früchten). Die Expression der HSS wurde über Western-Blot und Immunolokalisationsversuche nur in den jungen Blättern nachgewiesen (unveröffentlichte Ergebnisse von D. Niemüller und A. Reimann). Andere Ergebnisse lieferten biochemische Untersuchungen mit *H. indicum*. Hier wurde durch Fütterungsversuche mit [^{14}C]Putrescin und dem CAO- und PAO-Hemmstoff HEH festgestellt, dass die Wurzeln und der Spross Homospermidin bilden können [Frölich et al., 2007]. Ein nicht identifiziertes Zwischenprodukt wurde in beiden Pflanzenorganen nachgewiesen. Die Wurzeln von *H. indicum* sind in der Lage, die PA-Biosynthese bis zu diesem Zwischenprodukt und die Blätter bis zum vollständigen Alkaloid durchzuführen. Bei Fütterungen der Blätter mit [^{14}C]Homospermidin zeigte sich, dass Homospermidin zu 30% in die PA-*N*-Oxide eingebaut wurde [Frölich, 1996].

Fütterungsexperimente mit [^{14}C]Homospermidin mit oberirdischen Pflanzenorganen sind bei den beiden PA-Pflanzen *S. vernalis* und *E. cannabinum* nicht durchgeführt worden. Fest steht, dass durch den CAO- und PAO-Hemmstoff HEH in den Wurzeln von *Senecio vulgaris* Homospermidin angereichert wird und die gesamte PA-Biosynthese in den Wurzeln abläuft [Böttcher et al., 1993; Graser und Hartmann, 1997]. Bei der PA-Pflanze *Senecio vulgaris* (Asteraceae) konnte durch „Ringelungsexperimente“ nachgewiesen werden, dass die PAs über das Phloem zu den oberirdischen Speicherorten transportiert werden [Hartmann et al., 1989]. Die Speicherorte der PAs sind die für die Verteidigung und Fortpflanzung wichtigen Pflanzengewebe: der Blütenstand, die äußeren Gewebe der Blätter und des Stammes. In den Blüten wurde ein 10- bis 30-facher PA-Gehalt festgestellt im Vergleich zu den vegetativen Pflanzengeweben [Hartmann und Zimmer, 1986]. Ein möglicher Transport von Homospermidin von dem Syntheseort in den Wurzeln zu den oberirdischen Pflanzengeweben über das Phloem kann nicht ausgeschlossen werden.

Der höchste Homospermidin-Gehalt wurde bei *S. vernalis* in den Blüten (10 nmol/g Trockengewicht) und in den Wurzeln (13 nmol/g Trockengewicht) gemessen [Ober et al., 2003a]. In Pflanzen ist das ubiquitär vorkommende Primärstoffwechselenzym DHS vorhanden, das den gleichen Reaktionsmechanismus wie die HSS besitzt (siehe Einleitung - 1.3). Die DHS kann in einer Nebenreaktion aus Putrescin und Spermidin Homospermidin herstellen [Ober und Hartmann, 1999a, b], so dass ein Teil des gemessenen Homospermidins in den Blüten durch die DHS produziert worden sein kann. Der hohe Homospermidin-Gehalt könnte aber auch durch einen Homospermidin-Transport von der Wurzel zum Spross entstanden sein.

Die CAO-homologen Sequenzen aus *S. vernalis* der Genfamilie 1 (SVAO1) und der Genfamilie 3 (SVAO3) wurden aus den Blättern sowie aus der Wurzel identifiziert. Die Sequenzen der Genfamilie 2 (SVAO2) aus *S. vernalis* und der Genfamilie 1 (ECAO1) aus *E. cannabinum* sind aus den Wurzeln identifiziert worden. Durch eine RT-Reaktion mit den Full-Length-Expressionsprimern wurde bei der SVAO1 die Knospe als Ort der Transkription festgestellt. Bei der SVAO2 konnte als Transkriptionsort die Wurzel nachgewiesen werden. Ein anderes Ergebnis zeigten RT-Reaktionen mit neuen genspezifischen Primern. Hier wurde die Expression der SVAO1 und SVAO2 in allen Geweben nachgewiesen. Die stärkste SVAO2-Transkription erfolgte in den jüngeren, sich entwickelnden Pflanzenorganen. Die SVAO3-Transkription war in der Knospe, in der jungen Wurzel und in den älteren oberirdischen Geweben am stärksten. Bei der ATA01-Expression, einer Primärstoffwechsel-CAO von *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), haben Møller und McPherson [1998] festgestellt, dass dieses Gen sich in den differenzierenden Geweben des Wurzelgefäßsystems, den Tracheen des Hypocotyls und in den jungen, sich entwickelnden Blättern nachweisen lässt. In den Knospen zeigte sich die Expression nur temporär und war auf einige Blütengewebe beschränkt. Delis et al. [2006] haben die Transkription von zwei Primärstoffwechsel-CAOs von *Glycine max.* (Fabaceae) untersucht. Das GMAO1-Gentranskript war in der Wurzel und im Hypocotyl, d. h. der im Dunkeln sowie in

schnell wachsenden Geweben nachzuweisen. Das GMAO2-Gentranskript zeigte keine gewebespezifischen Unterschiede.

Nach Rea et al. [1998] gibt es bei der CAO von *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) einen Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge, der Aktivität und dem Entwicklungszustand. Bei im Dunkeln gewachsenen Keimlingen von *Lens culinaris* (Fabaceae) liegt mehr mRNA und eine höhere CAO-Aktivität als bei im Hellen gewachsenen Keimlingen vor [Maccarrone et al., 1991; Angelini et al., 1988]. Bei der CAO von *Pisum sativum* (Fabaceae) wurde eine Photochromregulation nicht ausgeschlossen [Joseph und Srivastava, 1995]. Die CAOs von *P. sativum* und *L. culinaris* sind im Rindenparenchymzellen der Wurzeln und in den basalen Internodien lokalisiert. Die Aktivität verschwindet in den Rindengeweben, wenn man die Wurzeln dem Licht aussetzt. [Laurenzi et al., 2001].

In dem vor Licht geschützten Gewebe der Wurzeln findet auch die Proteinsynthese der HSS von *S. vernalis* (Asteraceae) [Moll et al., 2002], von *E. cannabinum* [Anke, et al., 2004], von *Cynoglossum officinale* und von *Symphytum officinale* (Boraginaceen) statt. Anders ist es bei der Boraginaceae *Heliotropium indicum*. Hier wurde die HSS in den Epidermiszellen der Blätter lokalisiert (unveröffentlichte Ergebnisse D. Niemüller). Die CAO des Sekundärstoffwechsels wird in den Wurzeln der PA-Pflanzen neben den CAOs des Primärstoffwechsels vorliegen. In den oberirdischen Geweben werden die Primärstoffwechsel-CAOs und in geringer Menge (wenn überhaupt) die Sekundärstoffwechsel-CAOs transkribiert und translatiert werden. Eine Zuordnung, ob es sich um ein Primärstoffwechselenzym oder ein Sekundärstoffwechselenzym bei den identifizierten *S. vernalis*-Sequenzen handelt, ist auf Grund der RT-Reaktion nicht möglich. Wahrscheinlich sind die drei CAO-homologen *S. vernalis*-Sequenzen Primärstoffwechselenzyme, da sie in den meisten Pflanzengeweben transkribiert wurden.

CAOs sind bei Leguminosen im Apoplasten lokalisiert und sind mit den Zellwänden assoziiert [Federico und Angelini, 1986; Slocum und Furey, 1991]. Bei der Umsetzung der Polyamine bilden sie neben dem Aldehyd auch Wasserstoffperoxid, das von Peroxidasen zur Vernetzung von Lignin und Suberin und von apoplastischen Proteinen genutzt wird. Bei diesen Pflanzen spielen sie weiterhin bei der Abwehr von Mikroorganismen und bei Verwundungen eine Rolle [Rea et al., 2002].

Bei der Signalpeptidanalyse der drei SVAO-Sequenzen (*S. vernalis*) wurde eine völlig andere Lokalisation der Proteine festgestellt. Sie wurden in den Mitochondrien oder in den Peroxisomen lokalisiert. Wobei eine Lokalisation in den Peroxisomen wahrscheinlicher ist, da bei der oxidativen Aminierung von Polyaminen Wasserstoffperoxid entsteht (siehe Einleitung - 1.5). In den Peroxisomen ist die Catalase-Konzentration sehr hoch und Wasserstoffperoxid kann abgebaut werden. Es ist ein Schutz der Zelle vor entstehendem, toxischem Wasserstoffperoxid.

Die drei SVAO-Sequenzen wurden auf das Vorhandensein eines möglichen „Peroxisom-Target-Signal“ untersucht. Peroxisomale Proteine besitzen in der Mehrzahl ein peroxisomales Target-Signal vom Typ 1 (PTS1), das sich am C-Terminus des Proteins befindet. Es besitzt die konsensus Sequenz

(S/C/A)(K/R/H)(L/M) [Neuberger et al., 2003; Petriv et al., 2004]. Ein peroxisomales Target-Signal vom Typ 2 (PTS2) befindet sich am N-Terminus von Proteinen und besitzt die konsensus Sequenz (R/K)(L/V/I/Q)XX(L/V/I/H/Q)(L/S/G/K)X(H/Q)(L/A/F)) [Petriv et al., 2004]. Ein Nachweis auf ein Target-Signal vom Typ 1 oder 2 war bei den drei SVAO-Sequenzen nicht erfolgreich.

Bei Knollen von *Helianthus tuberosus* (Asteraceae) wurde eine CAO symplastisch in den Mitochondrien und den Peroxisomen lokalisiert. In dieser Nicht-Leguminose wurde eine Zellwandlokalisation nicht nachgewiesen und eine andere Funktion scheint nach Scoccianti et al. [1991, 1993] wahrscheinlich. Bei Zellen von *Picea abies* (Pinaceae) wurde eine CAO-Aktivität in der Zellwand, in den Zellbestandteilen ohne Zellwand und im gesamten Homogenat nachgewiesen [Santane und Simola, 1994]. Es wurde eine Kompartimentierung der Polyamine und ein alternativer Pathway zur Regulation der Polyaminkonzentration durch die CAO in der Zelle in Abhängigkeit von der Pflanzenentwicklung bei *Helianthus tuberosus* durch Torrigiani et al. [1989] und Scoccianti et al. [1991] vorgeschlagen. Eine Kompartimentierung von Homospermidin ist auch bei der PA-Biosynthese in den PA-Pflanzen nötig. In den Wurzeln von *Senecio vulgaris* (Asteraceae) wird Homospermidin ausschließlich in Retronecin umgewandelt [Böttcher et al., 1993]. Es findet kein oxidativer Abbau wie bei Putrescin und Spermidin durch Aminoxidasen statt. Erst wenn ein Rohextrakt aus den Wurzeln entsteht oder wenn Homospermidin exogen gefüttert wird, wird Homospermidin abgebaut. Homospermidin muss vor dem Abbau durch Enzyme des Primärstoffwechsels geschützt werden, da Homospermidin ein gutes Substrat für Polyaminoxidasen ist [Adolph, 1991]. Deshalb scheint die Oxidation von Homospermidin durch eine Sekundärstoffwechsel-CAO wahrscheinlich in einem vor Enzymabbau geschützten Zellorganell zu erfolgen, so dass eine Degradation von Homospermidin nicht erfolgen kann. Viele Alkaloidbiosynthese-Enzyme wurden in subzellulären Kompartments lokalisiert. Dabei können metabolische Kanäle und Multienzym-Komplexe, so genannte Metabolons, eine Rolle spielen [Facchini and St-Pierre, 2005]. Durch diese Multienzym-Komplexe wird eine Verdünnung von Intermediaten durch Diffusion verhindert, die Transportzeit von einem aktiven Zentrum zum nächsten reduziert, chemisch labile Intermediate geschützt und der schädigende Effekt von zytotoxischen Verbindungen minimiert [Panicot et al., 2002]. Eine CAO der Nicotinbiosynthese in *Nicotiana tabacum* ist wahrscheinlich ein Teil eines großen Multienzym-Komplexes [Heim und Jelesko, 2004].

Die CAOs und weitere Enzyme der PA-produzierenden Pflanzen müssen mit Hilfe von immunologischen und anderen Markierungstechniken lokalisiert werden, um ggf. so die Gewebe zu identifizieren, die für die Biosynthese der PAs in den Pflanzen verantwortlich sind. Erst dann ist eine genauere Analyse möglich, ob die gesamte PA-Biosynthese in einem oder mehreren Zelltypen stattfindet oder zusätzlich ein Transport in der Pflanze erfolgt. Bei *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) wird ein Wurzel-zu-Spross-Alkaloidtransport bei der Monoterpenoid-Indol-Biosynthese nicht ausgeschlossen und die Biosyntheseschritte können an mehreren Orten stattfinden [St-Pierre et al., 1999].

Eine Identifizierung des Sekundärstoffwechselenzyms, das Homospermidin in der PA-Biosynthese umsetzt, konnte nicht durch die RT-PCR und Signalpeptidanalyse erfolgen. Alle CAO-homologen *S. vernalis*-Sequenzen scheinen Primärstoffwechselenzyme zu sein. Dies würde aber bedeuten, dass auch Primärstoffwechsel-CAOs von *S. vernalis* in den Peroxisomen lokalisiert sind. Es können aber noch weitere Primärstoffwechsel-CAOs in *S. vernalis* vorhanden sein, die in der Zellwand lokalisiert sind und noch nicht identifiziert wurden.

4.3. Analyse und Vergleich der Aminosäuresequenz der SVAO und der ECAO

Im Zuge dieser Arbeit wurde der komplette offene Leserahmen von drei CAO-homologen cDNA-Sequenzen aus *S. vernalis* und der komplette offene Leserahmen einer CAO-homologen cDNA-Sequenz sowie ein weiteres CAO-homologes 3'-Ende aus *E. cannabinum* identifiziert. Die Funktion dieser Sequenzen konnte nicht nachgewiesen werden.

CAO-Name			Accession-Nr.	Literatur
PSAO1	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	AAA62490	[Tipping und McPherson, 1995]
PSAO2	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	BAA77206	-
LSAO	<i>Lens culinaris</i>	Fabaceae	CAA45526	[Rossi et al., 1992]
GMAO1	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	AAD40479	[Delis et al., 2006]
GMAO2	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	CAE47488	[Delis et al., 2006]
ELAO	<i>Euphorbia characias</i>	Fabaceae	AAD51007	[Padiglia et al., 2002]
CAAO	<i>Cicer arietinum</i>	Fabaceae	CAA08855	[Rea et al., 1998]
ATAO1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	AAB87690	[Moeller und McPherson, 1998]
MPO1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	ABI93948	[Heim et al., 2007]
AGAO	Histaminoxidase <i>Arthrobacter globiformis</i>	Bakterium	BAA07517	[Choi et al., 1995]
AGPAO	Phenylethylaminoxidase <i>A. globiformis</i>	Bakterium	AAA18114	[Tanizawa et al., 1994]
AGMAO	Methylaminoxidase <i>A. globiformis</i>	Bakterium	AAA22074	[Zhang et al., 1993]
MAO	Monoaminoxidase <i>E. coli</i>	Bakterium	BAA04900	[Azakami et al., 1994]
HPAO	peroximale Aminoxidase <i>Hansenula polymorpha</i>	Hefe	P12807	[Bruinenberg et al., 1989]
BSAO	<i>Bos taurus</i>	Säugetier	AAB30397	[Mu et al., 1994]
OSAO	<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	NP_001052338	-
CLAO	<i>Canavalia lineate</i>	Fabaceae	AAD49420	-
MPO2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	BAF49519	-
SLAO	<i>Solanum lycopersium</i>	Solanaceae	CAI39343	-
BJAO	<i>Brassica juncea</i>	Brassicaceae	AAL47166	-

Tabelle 58: Verwendete CAO-Aminosäuresequenzen zum Erstellen des Aminosäuresequenz-Alignments (siehe Abbildung 57) und zur phylogenetischen Analyse (siehe Abbildung 58 und Tabelle 60).

Es handelt sich um CAOs aus Pflanzen, Hefen, einem Säugetier und Bakterien. Diese Sequenzen stammen aus der (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein>)-Datenbank.

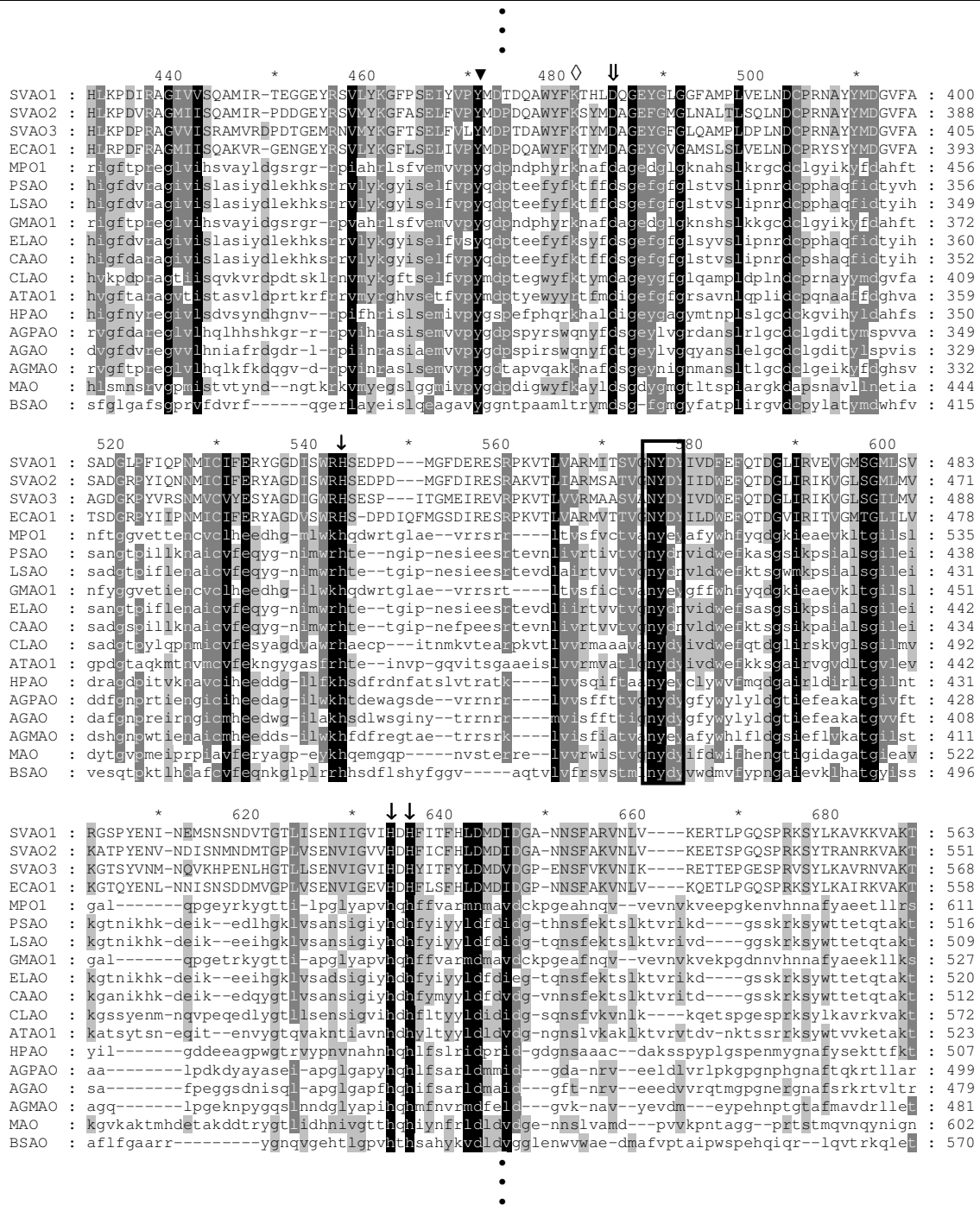


Abbildung 57: Aminosäuresequenz-Alignment (Teilausschnitt) von CAOs.

Konservierte Aminosäuren sind schwarz und grau unterlegt. Die Box kennzeichnet die konservierte Sequenz des aktiven Zentrums von CAOs. Drei Pfeile (↓) markieren die drei konservierten Histidinreste (H) und ein Pfeil (⇓) markiert die konservierte Base (D: Asparaginsäure) des aktiven Zentrums von CAOs. Eine Raute ◊ kennzeichnet den konservierten Lysinrest (K) und ein Dreieck ▼ kennzeichnet den konservierten Tyrosinrest (Y).

Die vier neu identifizierten Aminosäuresequenzen der beiden Asteraceen wurden mit Aminosäuresequenzen von CAOs aus der Datenbank (siehe Tabelle 58 und Tabelle 59) verglichen.

Die Aminosäuresequenzen aus Tabelle 58 stammen aus Pflanzen, Bakterien, Hefe und einem Säugetier. Sie sind als kupferhaltige Aminoxygenasen (Chinonproteine) identifiziert worden und ihre

Funktion wurde teilweise aufgeklärt. Für das Aminosäuresequenz-Alignment (siehe Abbildung 57) wurden hauptsächlich CAO-Aminosäuresequenzen verwendet, die in der Literatur näher untersucht und charakterisiert worden sind.

Die vier neuen Sequenzen besitzen alle für die Funktion einer CAO essentiellen Aminosäuren (siehe Abbildung 57 und Tabelle 59). In kupferhaltigen Aminoxydasen sind zwei verschiedene charakteristische Cofaktoren vorhanden (siehe Abbildung 4 in der Einleitung 1.5), der eine ist ein Kupfer(II)-Ion und der andere das 2,4,5-Trihydroxyphenylchinon (TPQ) [Cai und Klinman, 1994a; Matsuzaki et al., 1994; Wilce et al., 1997]. In den neuen Sequenzen der PA-Pflanzen ist die konsensus Sequenz N-Y-D/E der CAOs vorhanden (siehe Kasten in Abbildung 57), in der das Tyrosin zum TPQ wird [Janes et al., 1990; Mu et al., 1992]. Das TPQ ist an der katalytischen Reaktion des Enzyms mit dem Substrat beteiligt (siehe Einleitung - 1.5). Auch die drei konservativen Histidin-Reste (siehe ↓ in Abbildung 57), die als Kupferion-Liganden fungieren, konnten identifiziert werden. Die hoch konservierte Aminosäure Asparaginsäure Asp (siehe ↓↓ in Abbildung 57), die am Redox-Zyklus der reduktiven Halbreaktion durch eine α -Protonenabstraktion vom Substrat als katalytische Base beteiligt ist [Medda et al., 1995b; Mure et al., 2005], konnte in allen vier Sequenzen nachgewiesen werden. Ein Tyrosinrest spielt bei der Bildung einer Wasserstoffbrücke zum O-4 vom TPQ eine wichtige Rolle [Mura et al., 2007] und dieser ist in allen PA-Sequenzen nachweisbar (siehe ▼ in Abbildung 57). CAOs sind Glycoproteine [Medda et al., 1995c]. Die drei SVAO- und die ECAO1-Sequenzen besitzen zwei bis vier potentielle Glykosylierungsstellen. Kupferhaltige Aminoxydasen sind Homodimere mit einer 70-95 kDa großen Untereinheit [Medda et al., 1995a], die im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen sind um die 80 kDa pro Untereinheit groß.

Enzym	SVAO1	SVAO2	SVAO3	ECAO1	PSAO ¹	BSAO ¹	MAO ¹	HPAO ¹	AGAO ¹
Länge	720	708	726	716	674	672	757	692	684
Cofaktor TPQ aus Tyrosin	450	438	456	442	387	470	466	405	382
Asparagin- säure ↓↓	362	350	368	352	300	385	383	319	290
Histidin ↓	420 507 509	408 495 457	426 513 515	410 499 501	442 444 603	519 521 683	524 526 689	456 458 624	431 433 592
Tyrosin ▼	348	336	354	338	286	371	369	305	284
Lysin ◇	358	246	364	348	296	381 (T)	379	315	286 (Q)

Tabelle 59: Vergleich von kupferhaltigen Aminoxydasen - Konservierte Aminosäuren (siehe Abbildung 57) und Länge der Aminosäuresequenz (¹ nach Mura et al. [2007]). T: Threonin, Q: Glutamin.

Insgesamt enthalten CAOs 33 konservierte Aminosäuren, die sich in der Zentralregion und am C-Terminus der Sequenzen befinden [Tipping und McPherson, 1995]. Ein Primärstrukturvergleich der CAOs von *S. vernalis* und *E. cannabinum* mit den CAO-Sequenzen zeigt eine hohe Sequenzhomologie in diesen Regionen. Bei den pflanzlichen CAOs von *Euphorbia characias*, *Lens culinaris* und *Pisum sativum* (ELAO, LSAO und PSAO) hat ein Lysinrest (siehe ◇ in Abbildung 57

und in Tabelle 59) einen wichtigen Einfluss auf die Enzymaktivität [Mura et al., 2007]. Es wird spekuliert, dass er eine Rolle bei der Erkennung von positiv geladenen Aminogruppen spielt [Mura et al., 2007]. Er ist in pflanzlichen Enzymen außerdem wichtig für die Bildung der Radikalspezies während des Redox-Zyklus (siehe Einleitung - 1.5) [Mura et al., 2007]. Der identifizierte Lysinrest liegt vier Aminosäuren entfernt von der konservierten, katalytischen Base Asparaginsäure Asp. Dieser Lysinrest konnte bei den vier neuen Asteraceen-Sequenzen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 59). Bei der Rinderserum-Aminoxidase (BSAO) ist ein Threoninrest in Nachbarschaft mit einem Argininrest und bei der CAO von *Arthrobacter globiformis* (AGAO) ist ein Glutaminrest in Nachbarschaft mit einem Asparaginrest an dieser Position vorhanden. Das Fehlen des konservierten Lysinrestes könnte einen Einfluss auf den Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum der beiden CAOs haben, so dass die Radikalspezies hier nicht gebildet werden kann. Interessant sind die Sequenzen von *E. coli* und von *A. globiformis*. Bei diesen beiden CAOs konnte keine Radikalspezies nachgewiesen werden, aber es ist ein konservierter Lysinrest vorhanden. Diese Lysinreste werden vermutlich einen Einfluss auf die Substratspezifität haben [Mura et al., 2007].

Mit den Aminosäuresequenzen aus Tabelle 58 und den vier CAO-homologen Asteraceen-Sequenzen wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 58).

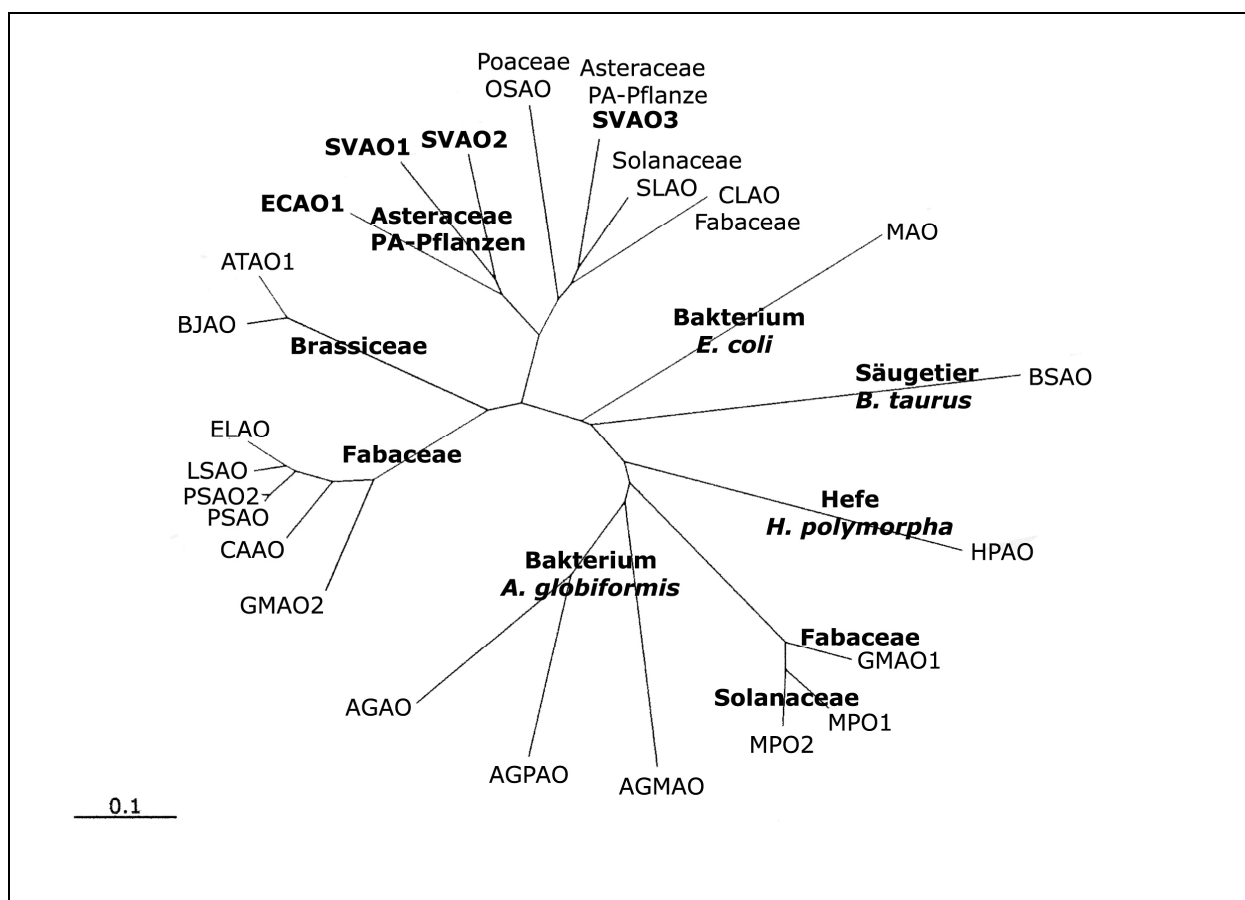


Abbildung 58: Phylogenetische Analyse von CAO-Sequenzen aus Tabelle 58 - Vergleich mit den vier CAO-homologen Sequenzen aus den PA-produzierenden Asteraceen-Pflanzen.

Die Sequenzen lassen sich in sieben Gruppen aufteilen. Die pflanzlichen CAOs bilden fünf Gruppen. Sie ordnen sich nach ihren Pflanzenfamilien. Dabei gibt es zwei Ausnahmen. Die CAO von *Glycine max.* GMAO1 (Fabaceae) und die beiden MPOs von *Nicotiana tabacum* (Solanaceae - CAOs des Nicotin- und Tropanalkaloidstoffwechsels) bilden eine Gruppe. Außerdem befindet sich die SVAO3-Sequenz aus *S. vernalis* in einer Gruppe mit CAOs, die aus verschiedenen Pflanzenfamilien (Poaceae, Solanaceae, Fabaceae) besteht. Die neu identifizierten SVAO1-, SVAO2- und ECAO1-Sequenzen aus den PA-Pflanzen (Asteraceae) bilden ihre eigene Gruppe. Auch die Bakterien-Sequenzen bilden zwei Gruppen. Die Säugetier-Sequenz und die Hefe-Sequenz bilden ihre eigenen Gruppen. Die GMAO1- und die beiden MPO-Sequenzen stehen den Bakterien-Hefe-Säugetiersequenzen näher als den Enzymen der Pflanzen.

Die Identität von Aminoxydase-Sequenzen liegt nach Amani et al. [2005] auf Aminosäureebene im Bereich von 20-99%. Die hier erhaltenen Ergebnisse entsprechen diesen Daten. Die vier CAO-homologen Asteraceen-Sequenzen sind den Fabaceen-Sequenzen am ähnlichsten, gefolgt von der Bakteriensequenz und der Säugetiersequenz (siehe Tabelle 60).

	SVAO1	SVAO2	SVAO3	ECAO1
SVAO1	x	75,8%	59,3%	70,3%
SVAO2	75,8%	x	62,1%	72,6%
SVAO3	59,5%	62,1%	x	58,1%
ECAO1	70,3%	72,6%	58,1%	x
PSAO	44,7%	46,1%	44,0%	44,1%
AGPAO	30,2%	32,9%	28,3%	32,4%
BSAO	28,5%	29,2%	27,2%	28,1%

Tabelle 60: Vergleich der Identitäten der vier identifizierten CAO-homologen Asteraceen-Sequenzen untereinander und mit einer CAO aus *Pisum sativum* (Fabaceae, PSAO), einer CAO des Rinderserums (Säugetier, BSAO) und einer CAO aus *Arthrobacter globiformis* (Bakterium, AGPAO) auf Aminosäureebene.

Die Homospermidinsynthase (HSS), das erste spezifische Enzym der Biosynthese des Necinbase-Grundkörpers in PA-Pflanzen, ist gemeinsam mit der Desoxyhypusinsynthase (DHS) durch Genduplikation aus einem Vorfahren entstanden [Ober und Hartmann, 1999b]. Daher weist die pflanzliche HSS eine hohe Sequenzidentität zur Primärstoffwechsel-DHS auf. Die DHS katalysiert die Übertragung einer Aminobutyl-Einheit des Spermidins auf einen spezifischen Lysin-Rest eines eIF-5A-Vorläuferproteins. Als Nebenaktivität besitzt sie die Fähigkeit Homospermidin zu bilden. Während der Evolution hat die HSS die DHS-Funktion, den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF5A zu binden, verloren. Sie kann nur noch Homospermidin bilden [Ober und Hartmann, 1999a, b; Ober et al., 2003a; Ober et al., 2003b; Reimann et al., 2004]. Es sind einige Beispiele für eine Funktionsänderung nach Genduplikation bekannt [Hashimoto und Yamada, 1994; Hashimoto et al., 1998; Frey et al., 2000; Gierl und Frey, 2001]. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass auch das Homospermidin-umsetzende Enzym in der PA-Biosynthese durch Rekrutierung aus einem CAO-codierenden Gen entstanden ist. Eine CAO des Primärstoffwechsels könnte ihre Funktion variiert oder intensiviert haben.

In den Asteraceen sind nur zwei Triben bekannt, die PAs enthalten. Es sind die *Senecioneae* und *Eupatorieae*, die keine Schwestergruppen sind und bei denen die HSS unabhängig voneinander nach der Trennung der beiden Linien entstanden ist [Reimann et al., 2004]. Interessant wäre der Vergleich der phylogenetischen Bäume DHS/HSS und CAO(Primärstoffwechsel)/CAO(PA-Sekundärstoffwechsel). Es müssen weitere CAO-Sequenzen von PA-bildenden Pflanzen identifiziert und die Funktion aufgeklärt werden, um die Evolutionsgeschichte der CAOs interpretieren und mit der HSS/DHS vergleichen zu können. Durch Southern-Blot-Analysen wurde spekuliert, dass die CAO von *Lens culinaris* (LSAO) zu einer Multigen-Familie mit einer geringen Anzahl an Kopien gehört [Tiburcio et al., 1997]. Auch die MPO1 aus *N. tabacum* ist Teil einer Multigen-Familie mit sechs Mitgliedern [Heim et al., 2007]. Bei *Glycine max*, bei *Arabidopsis thaliana*, bei *Pisum sativum* und bei *Bos taurus* wurde nicht nur eine cDNA-Sequenz einer kupferhaltigen Aminoxidase entdeckt [Hogdall et al., 1998; Delis et al., 2006; Eller et al., 2006], so dass neben den schon identifizierten CAO-homologen Sequenzen noch weitere CAO-Sequenzen in *S. vernalis* und *E. cannabinum* vorhanden sein können.

4.4. Expressionsbedingungen

CAOs verschiedener Organismen konnten erfolgreich heterolog in verschiedenen Expressionswirten exprimiert werden: z. B. die bakterielle Phenylethylaminoxidase von *Arthrobacter globiformis* (AGPAO) und die bakterielle Monoaminoxidase (MAO) in *E. coli* [Matsuzaki et al., 1994; Tanizawa et al., 1994; Matsuzaki et al., 1995; Nakamura et al., 1996], die Aminoxidase von *Hansenula polymorpha* (HPAO) in *Saccharomyces cerevisiae* und in *E. coli* [Cai und Klinman, 1994b; Cai et al., 1997] und die menschliche Nieren-Diaminoxidase in *Drosophila*-S2-Zellkulturen [Elmore et al., 2002]. Die funktionelle Expression von CAOs von höheren eukaryotischen Organismen hat in der Vergangenheit schon bei der Aminoxidase aus *Pisum sativum* (PSAO) Probleme bereitet, da hier Inclusion-bodies bei der *E. coli*-Expression aufgetreten waren [Koyanagi et al., 2000]. Nur die Expression mit Hilfe des Hefe-Expressionssystems *Pichia pastoris* hat zum Erfolg geführt [Koyanagi et al., 2000]. Aus diesem Grunde wurde bei der heterologen Expression der CAO-homologen Sequenzen aus *S. vernalis* neben dem *E. coli*-Expressionssystem die Zellen von *Pichia pastoris* verwendet. Auch hier wurden bei dem bakteriellen Expressionssystem die Proteine in Form von Inclusion-bodies in den Bakterienzellen abgelagert. Mit dem *P. pastoris*-Hefe-Expressionssystem konnte keine Expression der SVAO1-Sequenz, kloniert in den pPICZB-Vektor, nachgewiesen werden.

Für die Funktion einer CAO ist es wichtig, dass die Bildung des TPQs im aktiven Zentrum durch die posttranslationale Modifikation erfolgt. Zur Biogenese des TPQs aus dem Tyrosin-Rest sind Kupferionen und molekularer Sauerstoff nötig [Kim et al., 2002; Brazeau et al., 2004]. Es müssen zwei Mol Kupferionen pro Mol Protein vorhanden sein, um die vollständige Aktivität des Enzyms zu erhalten [Suzuki et al., 1986; Matsuzaki et al., 1994]. Bei dem kupferfreien Linsen-Enzym und der kupferfreien Rinderserum-Aminoxidase wurde keine Enzymaktivität gemessen [Rinaldi et al., 1984;

Suzuki et al., 1986]. Bei den *E. coli*-SVAO-Expressionen (cDNA1 und cDNA2, *S. vernalis*) wurden 8 μM Kupfer(II)-Ionen zum Expressionsmedium gegeben, die keinen Einfluss auf die Expressionsstärke des Proteins zeigten und nur zur Unterstützung der TPQ-Bildung dienen sollten.

Auch bei den Aminoxidase-Expressionen in *E. coli* von Matsuzaki et al. [1995] und Dove et al. [2000] wurden stöchiometrische Mengen bis zum 10fachen Überschuss an Kupfer(II)-Ionen zugefügt, um eine Aktivität zu erhalten. Bei einem eisenhaltigen Enzym der Isoprenoidbiosynthese wurden Eisenionen zur Rekonstitution des Fe-S-Zentrum im Apoenzym zugefügt [Seemann et al., 2005].

In Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* ist die intrazelluläre freie Kupferionenkonzentration extrem gering, so dass diese nicht ausreichen würde, um eine Aktivierung der CAOs zu erzielen [Rae et al., 1999]. Die CAOs würden in diesem Organismus als inaktive Vorstufe des Apo-Proteins vorliegen. Bei der PSAO, die in *Pichia pastoris* exprimiert wurde, konnte durch 50 μM CuSO_4 -Zugabe zum Medium eine erhöhte Aktivität gemessen werden [Koyanagi et al., 2000]. Bei den Versuchen, die SVAO1-Sequenz (cDNA1, *S. vernalis*) in *P. pastoris* zu exprimieren, wurden Cu(II)-Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen zum Medium zugefügt, die aber keinen messbaren Einfluss auf die Proteinausbeute und die Aktivität zeigten. Eine neue Expressionsmöglichkeit wäre die Verwendung eines Hefevektors mit einem α -Faktor (Sekretionssignal von *S. cerevisiae*), womit das große Hindernis der Zellwand, die nur durch eine French-Press aufzubrechen war, beseitigt wäre. Die exprimierten Proteine würden durch das Sekretionssignal ins Kulturmedium ausgeschleust.

Die Aktivität von einer CAO (Monoaminoxidase) von *E. coli* wurde durch Metallionen (Ni^{2+} , Li^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) nicht gehemmt [Roh et al., 1994]. Es ist keine Angabe über die eingesetzten Konzentrationen in der Literatur vorhanden. Anders sieht es bei der Aminoxidase von *Hyoscyamus niger* (Solanaceae) aus. Hier erfolgte eine Hemmung um 60-80% bei 1 mM Substratzusatz durch Cobalt- und Nickelchlorid [Hashimoto et al., 1990]. Bei der CAO von *Hansenula polymorpha* verhindern Zinkionen die TPQ-Bildung [Cai et al., 1997]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Cofaktorbildung bei der Phenylethylaminoxidase von *Arthrobacter globiformis* durch Nickel- und Cobaltionen katalysiert wird, aber die resultierende Aktivität sehr gering ist [Okajima et al., 2005]. Deshalb sollten die Ni-NTA-Reinigung und die Talon[®]-Reinigung keinen Einfluss auf die Funktion des Enzyms gehabt haben.

Bei CAOs wurden Disulfidbrücken durch Kumar et al. [1996], Wilce et al. [1997], Li et al. [1998], Duff et al. [2006] nachgewiesen. Auch besitzt die CAO aus Latex von *Euphorbia characias* für die Funktion wichtige SH-Gruppen [Floris et al., 1983]. Durch DTT-Zusätze zu den Lösungen sollte eine Stabilisierung der SH-Gruppen/Disulfidbrücken und so eine Unterstützung der Rückfaltung erreicht werden. Bei den Aktivitätstests mit Pflanzenrohextrakten erfolgte keine Hemmung durch diese Zugabe. Andererseits wurde ein Einfluss auf die Biogenese des Cofaktors durch Ruggiero et al. [1997] festgestellt. Das DTT als Reduktionsmittel kann das Kupfer(II) im aktiven Zentrum der CAOs zu Cu(I) reduzieren. Aus diesem Grund wurde das DTT bei der Renaturierung der SVAO1 ohne

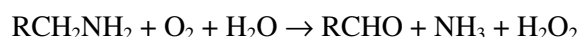
Signalpeptidsequenz (cDNA1, *S. vernalis*) erst nach einigen Tagen in einer sehr geringen Konzentration zum Dialysepuffer zugefügt.

Zur Expression der CAO-homologen SVAO-Sequenzen in *E. coli* wurde ein pET-Vektor mit Kanamycin-Resistenz verwendet. Das 3'-Ende der zu exprimierenden Sequenz war mit dem 5'-Ende der His-Tag-Sequenz des Vektors fusioniert. Die offenen Leserahmen der SVAO1- und SVAO2-Sequenzen (cDNA1 und cDNA2, *S. vernalis*) wurden mit und ohne Signalpeptidsequenz kloniert und exprimiert. Die exprimierte SVAO1 und SVAO2 wurden als Inclusion-bodies in den Bakterienzellen abgelagert. Diese Aggregate sollten durch eine aufwändige Dialyse in die aktive Konformation zurückgebracht werden. Dies war nur bei der SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz erfolgreich.

Eine andere Möglichkeit zur Vermeidung von Inclusion-bodies ist die Verwendung eines Vektors, der das Protein in den periplasmatischen Raum dirigiert. Dies wurde schon erfolgreich bei dem LUSH-Protein angewendet [Zhou et al., 2004]. Eine weitere Möglichkeit Inclusion-bodies zu vermeiden, ist eine Coexpression mit Chaperonen. Die SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz (cDNA1, *S. vernalis*) wurde durch eine Coexpression mit den Chaperonen der Hsp70-Familie als lösliches Protein erhalten. Lösliches aktives Protein zu erhalten, soll auch durch die Verwendung des Expressionsstamms *E. coli* BL21(DE3) Rosetta gami möglich sein. Dieser Bakterienstamm besitzt Plasmide, die für seltene tRNAs in *E. coli* codieren. Weiterhin unterstützt er eine verstärkte Disulfidbrückenbildung.

4.5. Aktivitätsmessung

CAOs katalysieren eine oxidative Deaminierung von Aminen an der primären Aminogruppe begleitet von einer Reduktion von Sauerstoff. Dabei entstehen als Reaktionsprodukte ein Aldehyd, Ammoniak und Wasserstoffperoxid.



Zur Bestimmung der Enzymaktivität ist eine Vielzahl von Methoden in der Literatur bekannt. Die Bestimmung des entstehenden Ammoniaks erfolgt über eine photometrische Messung des Abbaus von NADH zu NAD⁺ durch eine Glutamatdehydrogenase. Diese Methode ist sehr störanfällig und nicht sehr empfindlich [Bergmeyer, 1983]. Weiterhin kann eine polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgen. Diese Assay-Methode wird recht oft genutzt, benötigt aber ein teures Messgerät, das nicht standardmäßig in einem Labor zu finden ist. Sehr häufig wird das entstehende Wasserstoffperoxid bestimmt. Die älteste Methode ist die Stärke-Jod-Färbung [Smith, 1970]. Häufig erfolgt die Bestimmung des Wasserstoffperoxids über kolorimetrische Methoden. Diese wurden auch in dieser Arbeit angewendet. Die Methode nach Cona et al. [1993] zeigte sich sehr störanfällig und lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Titansulfatmethode nach Nag et al. [2000] erwies sich als umständlich und nicht für direkte Bestimmungen mit Rohextrakten geeignet. Ebenso war die ABTS-Photometrie nach Szutowicz et al. [1984] nicht reproduzierbar und zeigte große Streuungen bei den Messwerten. Deshalb wurde die Bestimmung des entstehenden Wasserstoffperoxids als

Aktivitätstest nicht weiter verfolgt. Der angewendete Aktivitätstest mit Hilfe der nativen PAGE und der ABTS-Färbung nach Koyanagi et al. [2000] war einfach durchführbar, zeigte aber nur bei dem Erbsenrohextrakt eine Graufärbung an. Mit diesem Assay können nur Enzyme mit einer hohen Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Auch können bei CAO-Aktivitätsmessungen die entstehenden Produktaldehyde bestimmt werden. Aldehyde können durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin und Aminogruppen durch Ninhydrin photometrisch bestimmt werden [Tabor, 1951; Naik et al., 1981]. Daher wurde 2,4-Dinitrophenylhydrazin in dieser Arbeit zum qualitativen Nachweis der Aldehyde als Sprühereagenz für die Dünnschichtchromatographie angewendet.

Bei Verwendung des Substrates Putrescin entsteht aus dem Produkt Aminobutanal durch Zyklisierung 1-Pyrrolin, das auf Grund seiner Löslichkeit mit Toluol extrahiert und über Szintillationsmessung bestimmt werden kann [Okuyama und Kobayashi, 1961].

CAOs sind Chinonproteine und enthalten als charakteristischen Cofaktor das TPQ, das durch eine posttranslationale Modifikation aus Tyrosin entsteht. Das TPQ der Chinonproteine wird sehr häufig durch eine Redox-Färbung nachgewiesen. Diese NBT-Methode hat den Vorteil, dass sie in Kombination mit einem Western-Blot angewendet werden kann [Paz et al., 1991; DuBois und Klinman, 2004]. Diese Färbung war bei den Erbsenrohextrakten und bei den mit der FPLC-aufgereinigten Homospermidin-umsetzenden Enzymen aus Wurzelrohextrakten von *E. cannabinum* und *S. vernalis* erfolgreich. Nur erwies sich die Färbung als sehr lichtempfindlich und nicht gut zur Dokumentation geeignet. Bei der heterolog exprimierten SVAO1 (cDNA1, *S. vernalis*) war keine Färbung nach dem Blotten nachweisbar. Dies kann an einer nicht vollständig erfolgten Biogenese des TPQs während der Rückfaltung der solubilisierten Inclusion-bodies bei der Dialyse gelegen haben, so dass die Chinonprotein-Konzentration für eine Redoxfärbung zu gering war.

Das Problem bei den genannten Aktivitätsmessungen ist, dass keine Unterscheidung zwischen einem Primär- und einem Sekundärstoffwechselezym getroffen werden kann. Dazu eignet sich z. B. die Dansylierung der Produkte nach Bachrach und Plesser [1986] mit anschließender DC-Auftrennung und Fluoreszenzdetektion. Diese ist wiederum empfindlicher als eine Chemilumineszenzmessung, benötigt aber spezielle Apparaturen. Auch ist nach einer Derivatisierung eine HPLC-Messung möglich. Der in dieser Arbeit entwickelte Aktivitätstest basiert auf der hochempfindlichen radioaktiven Messmethode. Die Probe wurde mit radioaktivem Substrat, Catalase, Alkoholdehydrogenase und NADH inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Damit sollte die Proteindenaturierung gering bleiben und die Reaktion gegenüber Raumtemperatur beschleunigt ablaufen. Nach der Inkubation wurden die im Ansatz enthaltenen Substanzen durch Dünnschichtchromatographie im Polyamin-Fließmittel aufgetrennt und vermessen. So konnte das Substrat von den entstehenden Produkten durch Vergleich der R_f -Werte mit Referenzsubstanzen unterschieden werden. Auch ließen sich größere Ansätze für die HPLC-Messung und die GC-MS-Messung vorbereiten.

In Leguminosen liegt die CAO-Aktivität in der Größenordnung von $\mu\text{mol pro mg Protein pro Minute}$, in anderen Dicotylenpflanzen beträgt sie $\text{nmol oder pmol pro mg Protein pro Minute}$, wie z. B. bei den Cucurbitaceae, Compositae oder Solanaceae. Aufgrund dieser geringen spezifischen Aktivitäten wird diesen CAOs eine andere Rolle in der Zelle zugeordnet [Federico und Angelini, 1991; Scoccianti et al., 1993]. Die Rinderplasma-Aminoxidase (BPAO) zeigte mit Homospermidin als Substrat eine sehr geringe Enzymaktivität [Houen et al., 2005]. Hier wurde nach 7-24 Stunden bei 37°C ein 10%iger Umsatz mit $25\ \mu\text{l}$ BPAO ($0,01\ \text{mg/ml}$) mit $0,1\ \text{mM}$ Homospermidin verzeichnet und es wurden sogar noch $50\ \mu\text{l}$ BPAO zugefügt, um einen größeren Umsatz (40% Umsatz nach 48 Stunden) zu erreichen. In den Wurzelrohextrakten von *S. vernalis* und *E. cannabinum* (Asteraceae) wurde das zugesetzte [^{14}C]Homospermidin erst nach vier Stunden umgesetzt.

Zur Bildung des Necinbase-Grundkörpers ist eine Reduktion der Carbonylgruppe des Iminiumions (siehe Einleitung - 1.3) durch eine Alkoholdehydrogenase zur Alkoholgruppe notwendig [Khan und Robins, 1985]. Die Aktivitätstests erfolgten aus diesem Grunde mit einem Alkoholdehydrogenase- und NADH-Zusatz. Um eine Reduktion der entstandenen Aldehydgruppe zu erreichen, wurde von Farnum et al. [1986] das Assay einer Rinderplasma-Aminoxidase mit Dopamin als Substrat mit einer Alkoholdehydrogenase und NADH versetzt. Ähnliche Aktivitätsmessungen führten Chiu et al. [2006] mit einer *A. globiformis*-Aminoxidase und mit 2-Phenylethylamin als Substrat durch. Die Verwendung von NADH und der Alkoholdehydrogenase hat den Vorteil, dass die Absorptionsabnahme bei $340\ \text{nm}$ durch Oxidation von NADH zu NAD^+ photometrisch gemessen werden kann. In einer anderen Untersuchung von Hartmann und Klinman [1987] war stattdessen bei der Rinderplasma-Aminoxidase mit Benzylamin als Substrat kein Unterschied bei der Verwendung mit oder ohne Reduktionsmittel feststellbar. Einen Einfluss von NADH/NAD bzw. von der Alkoholdehydrogenase auf den Umsatz von Homospermidin als Substrat zeigten Inkubationen mit Wurzelrohextrakten von *E. cannabinum* und *S. vernalis*.

Die Aminoxidase von *Pisum sativum*, aus der Schweineleiere, aus dem Rinderserum und von *E. coli* werden durch Wasserstoffperoxid inaktiviert [Mann, 1955; Mondovi et al., 1967; Steinebach et al., 1996, Pietrangeli et al., 2000]. Durch das Wasserstoffperoxid kann eine Veränderung der Proteinstruktur erfolgen [Mondovi et al., 1967]. Die Inaktivierung der Rinderserum-Aminoxidase (BSAO) durch Wasserstoffperoxid mit Benzylamin als Substrat wird begleitet durch eine irreversible Veränderung des TPQs. Dies wurde auch bei einer Pferde-Aminoxidase und der menschlichen Nieren-Aminoxidase beobachtet [Lee et al., 2001]. Eine andere Möglichkeit der Inaktivierung durch Wasserstoffperoxid ist die Bildung eines Hydroxylradikals. Ein konservierter Tyrosinrest des aktiven Zentrums wird zum Radikal, so dass sich die Konformation im aktiven Zentrum ändert. Die Wasserstoffbrücken zum TPQ verändern ihren Abstand und das Enzym ist inaktiv [Castellano et al., 1993; Steinebach et al., 1996, Pietrangeli et al., 2003].

Bei der BSAO zeigte sich, dass der Verlust der katalytischen Aktivität mit der Zeit und der Substratkonzentration zunimmt. Ein Zusatz von Catalase konnte die Inaktivierung verhindern

[Pietrangeli et al., 2000]. Die Hemmung der BSAO lag am entstehenden Wasserstoffperoxid, das während der oxidativen Halbreaktion entsteht. Bei der BSAO konnte ein Catalasezusatz von 0,6 U/ μ l die Inaktivierung der Reaktion mit Benzylamin als Substrat verhindern [Pietrangeli et al., 2004]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Catalasekonzentration auf 0,7 U/ μ l bei den durchgeführten Inkubationen erhöht. Eine Verbesserung des Substratumsatzes bei den Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz, *S. vernalis*) nach Rückfaltung der Inclusion-bodies durch Dialyse war nicht zu messen.

Die Biogenese des Cofaktors TPQ und die oxidative Halbreaktion benötigen Sauerstoff, während für die reduktive Halbreaktion der CAOs kein Sauerstoff notwendig ist. Wenn ein Mangel an Sauerstoff während der Reaktion vorliegt, findet die oxidative Halbreaktion nicht statt und der Cofaktor liegt in seiner reduzierten Form vor (siehe Einleitung - 1.5). Die Sauerstoffzufuhr zur Lösung während der Inkubation war durch die Diffusion an der Flüssigkeitsoberfläche limitiert. Da der Zusatz von Catalase bei den Versuchen zur Beseitigung der Inaktivierung nicht ausreichend war, wurde die Luftzufuhr durch gelegentliches Mischen des Reaktionsansatzes, seitlicher Belüftung und offener Inkubation mit Schütteln erhöht. Hier nach war bei der rekombinanten SVAO1os (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz, *S. vernalis*) nach Rückfaltung der Inclusion-bodies durch Dialyse ein Umsatz mit Putrescin als Substrat nach einer Stunde Inkubation bei 30°C messbar.

Es gibt aber auch noch andere Ursachen, warum keine Umsätze bei den Inkubationen mit der rekombinanten SVAO1 (cDNA1, *S. vernalis*) nach Rückfaltung der Inclusion-bodies durch Dialyse nachweisbar waren. Mechanismusbasierende Hemmstoffe nach Walsh [1984] reagieren mit Produkten des Redoxzykluses (siehe Einleitung - 1.5) oder mit Aminosäureresten des Enzyms [Frebort et al., 2000; Shepard et al., 2002; Padigla et al., 2004; Longu et al., 2005a; Qiao et al., 2006]. Bei der pflanzlichen *Lathyrus cicera*-Aminoxidase war eine Inaktivierung von der Art des Substrates und von der Substratkonzentration abhängig. Putrescin als Substrat konnte die CAO sogar mit Catalasezusatz vollständig inaktivieren. Der Produktaldehyd oder das 1-Pyrrolin hat mit den nukleophilen Resten des Enzyms reagiert [Pietrangeli et al., 2004]. Ähnliches wurde bei der *Lens culinaris*-Aminoxidase mit Spermidin als Substrat beobachtet. Hier trat eine reversible Hemmung durch den Produktaldehyd auf [Cogoni et al., 1991]. Auch wird die Aminoxidase von den *Hyoscyamus niger*-Wurzelkulturen (Solanaceae) durch einige Amine gehemmt, so dass die Tropanalkaloidsynthese vermindert abläuft [Hashimoto et al., 1990].

Mehrere kupferhaltige Aminoxidasen sind in ihrer Struktur aufgeklärt worden, zu denen gehören u. a. die CAO aus *E. coli*-, aus *Pisum sativum*- und aus dem Rinderserum [Roh et al., 1994; Kumar et al., 1996; Lunelli et al., 2005; Duff et al., 2006]. Sie gliedert sich in drei Domänen D2, D3 und D4. Nur die CAO von *E. coli* besitzt vier Domänen. Die größte Domäne D4 liegt am C-Terminus (ca. ab Aminosäure 300 bis zum Ende) und enthält das aktive Zentrum mit den drei konservierten Histidinresten sowie die konservierte aktive Base. Wichtig für die Funktion der CAOs sind außerdem die Aminosäuren, die den Tunnel zum aktiven Zentrum bilden. Dazu zählen die negativen

Seitenketten von der Domäne D3, die den Eingang bilden und auch einige Aminosäuren der Domäne D4, durch die die Tunneloberfläche hydrophober als das aktive Zentrum wird [Wilce et al., 1997; Matsuzaki und Tanizawa, 1998]. Wenn diese Aminosäuren verändert sind, könnte eine verminderte Enzymaktivität die Folge sein.

Durch Vergleich der Aminosäuresequenz der zusammengesetzten Sequenzen nach der Amplifikation mit den degenerierten Primern, der 3'RACE sowie der 5'RACE mit den beiden kontrollsequenzierten Sequenzen der SVAO1- und SVAO2-Sequenzen mit und ohne Signalpeptidsequenz waren einige Unterschiede in einzelnen Aminosäurepositionen festzustellen. Die Veränderung einzelner für die Generation des TPQs und für den Reaktionsmechanismus wichtiger Aminosäuren, die meist in der Domäne D4 liegen, bewirkt eine drastische Änderung in der chemischen Reaktivität des Enzyms [Murray et al., 2001; DuBois und Klinman, 2005, 2006].

Die identifizierten Aminosäuresequenzen der PA-Pflanzen weisen alle CAO-charakteristischen Merkmale (siehe 4.3) auf. Bei der pflanzliche CAO von *P. sativum* wurden die drei Domänen D2, D3 und D4 identifiziert [Kumar et al., 1996]. Die pflanzlichen Aminosäuresequenzen von *P. sativum*, *L. culinaris* und *E. characias* besitzen untereinander nach Mura et al. [2007] eine Identität von 92%. Zu den vier neuen CAOs hat die CAO von *P. sativum* nur eine ca. 40% Identität. Es darf trotzdem angenommen werden, dass auch die drei Domänen in den CAOs der PA-Pflanzen vorhanden sind und diese eine ähnliche Struktur besitzen. Die Aminosäureunterschiede der SVAO-Sequenzen (cDNA1 und cDNA2, *S. vernalis*) liegen in den Domänen D2 und D3. Damit ist es eher unwahrscheinlich, aber nicht vollständig auszuschließen, dass die geringe Enzymaktivität nach der Dialyse auf Grund von Fehlern bei der Amplifikation durch die Polymerasen verursacht wurde.

Wahrscheinlicher ist, dass die verminderte bzw. fehlende Aktivität der Enzyme eher durch eine nicht vollständige oder „falsche“ Renaturierung der Inclusion-bodies (Tertiärstruktur) verursacht wurde, als durch „falsche“ Aminosäuren (Primärstruktur). Das CAO-Protein befindet sich in einer nicht aktiven Struktur. Durch diese „falsche“ Konformation kann sich das TPQ nicht bilden, die Struktur ermöglicht dem Substrat keinen Zugang zum aktiven Zentrum oder die Redoxreaktion kann während der Katalyse nicht ablaufen. Einen Einfluss auf die Aktivität der CAOs hätte auch eine Zerstörung der Kontaktstellen der beiden Monomere, die zusammen das Homodimer bilden (siehe Einleitung - 1.5). Diese sind am C-Terminus und am aktiven Zentrum lokalisiert [Amani et al., 2005]. Wenn sich die Wasserstoffbrücken bei der Renaturierung der IBs nicht richtig oder nur unvollständig bei der Zusammenlagerung der beiden Monomere gebildet haben, wäre keine Aktivität messbar.

Der Tunnel, den das Substrat im Homodimer von CAOs passieren muss, um das aktive Zentrum mit dem TPQ zu erreichen, ist durch Aminosäurereste negativ geladen [Wilce et al., 1997; Matsuzaki und Tanizawa, 1998]. Bei Aktivitätstests mit den Wurzelrohextrakten von *E. cannabinum* und *S. vernalis* als auch bei Rohextrakten von *P. sativum* sowie mit dem rekombinanten SVAO1os-Protein (cDNA1 ohne Signalpeptidsequenz, *S. vernalis*) war bei einem pH-Wert ≥ 7 eine Aktivität zu messen. Kaum

Stoffumsatz war bei pH-Wert 4 zu verzeichnen. Das Substrat liegt bei einem pH-Wert von > 7 in der protonierten Form vor und kann den Tunnel passieren.

5. **Ausblick**

Auf molekularbiologischer Ebene wurden in dieser Arbeit drei CAO-homologe Sequenzen aus *S. vernalis* (Asteraceae) und eine CAO-homologe Sequenz sowie ein weiteres CAO-homologes 3'-Ende aus *E. cannabinum* (Asteraceae) identifiziert. Zwei Sequenzen aus *S. vernalis* wurden mit und ohne Signalpeptidsequenz in *E. coli* heterolog exprimiert. Dabei waren Inclusion-bodies entstanden. Verschiedene Strategien wurden gewählt, um aktives Protein zu erhalten. Dazu zählten die Coexpression mit Chaperonen, Expression in einem Eukaryonten (*P. pastoris*) und eine Rückfaltung nach Solubilisierung durch Dialyse. Weitere Möglichkeiten zum Erhalt von aktivem, nativem Protein sollten getestet werden. Dazu gehören u. a. die Expression in dem Bakterienstamm *E. coli* Rosetta gami, Verwendung von *E. coli*-Vektoren, die das Protein in den periplasmatischen Raum dirigieren, die Verwendung von Hefevektoren zur Exkretion des exprimierten Proteins in das Nährmedium und andere Hefestämme. Eine biochemische Charakterisierung der vier Sequenzen aus *S. vernalis* und *E. cannabinum* steht noch aus. Es muss auch das fehlende 5'-Ende der zweiten CAO-homologen Sequenz aus *E. cannabinum* identifiziert und charakterisiert werden.

Das gesuchte Homospermidin-umsetzende Enzym in *S. vernalis* als auch in *E. cannabinum* wurde nicht entdeckt. Neben den molekularbiologischen Versuchen wurden auch biochemische Techniken zur Identifizierung dieses Enzyms begonnen. Das angewendete FPLC-Reinigungsverfahren muss weiter optimiert werden. Dabei sollte eine mehrstufige Reinigung mit modifizierten Puffergradienten getestet werden.

Auch muss durch Tracerexperimente mit radioaktivmarkiertem Homospermidin gezeigt werden, dass in *E. cannabinum* und *S. vernalis* die Wurzel und nicht die oberirdischen Organe der Pflanzen der exklusive Syntheseort des Necinbase-Grundkörpers ist.

Bis zum Schluss dieser Arbeit wurden die Parameter Inkubationstemperatur, -zeit, -zusätze und -apparatur für einen CAO-Aktivitätstest variiert. Der Aktivitätstest muss weiter optimiert werden. Es zeigte sich, dass die Sauerstoffversorgung einen großen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte. Auch sollte der Einfluss von NAD⁺, NADH, Catalase und Alkoholdehydrogenase weiter untersucht werden. Bei den durchgeführten Inkubationen sind Produkte entstanden, die mit Hilfe von Standards durch die Dünnschichtchromatographie nicht ausreichend identifiziert werden konnten, so dass hier weitere GC-MS-Messungen zur Produktidentifizierung erfolgen müssen. Wenn die chemische Struktur identifiziert ist, können Aussagen über die erfolgte Reaktion sowie die beteiligten Enzyme erfolgen.

Die Homospermidinsynthese ist in den Pflanzenfamilien der PA-Pflanzen während der Evolution mehrmals unabhängig voneinander entstanden. Ein Vergleich der Evolutionsgeschichte der HSS mit der Evolutionsgeschichte der Primärstoffwechsel- und Sekundärstoffwechsel-CAOs der PA-Pflanzen wäre interessant. Deshalb müssen weitere CAO-homologe Sequenzen in verschiedenen PA-Pflanzen identifiziert und charakterisiert werden. Weiterhin sollte auch auf Gewebe- und Zellebene die Expression der CAOs untersucht werden und mit den vorhandenen HSS-Expressionsmustern verglichen werden.

6. Zusammenfassung

1. Um eine Positivkontrolle für einen Aktivitätstest für kupferhaltige Aminoxydase (CAO) zu etablieren und auch das Reaktionsverhalten von CAOs zu untersuchen, wurden Rohextrakte von *Pisum sativum* (Fabaceae) und eine käuflich erwerbbare kupferhaltige Aminoxydase des Rinderplasmas (BPAO) mit verschiedenen Di- und Polyaminen inkubiert und die entstandenen Produkte mit der Dünnschichtchromatographie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Rinderplasma-Aminoxydase nicht als Positivkontrolle geeignet war.
2. Es wurde postuliert, dass es sich bei dem Enzym, das Homospermidin als Substrat in den Pflanzen bei der Necinbase-Biosynthese verwendet, um eine CAO handelt. Um diese CAO in den PA-Pflanzen *S. vernalis* (Asteraceae) und *E. cannabinum* (Asteraceae) zu identifizieren, wurden Wurzelrohextrakte mit Homospermidin als Substrat inkubiert. Die Produkte wurden mit dem RITA-System untersucht. Es wurden vier Produkte nachgewiesen. Eine GC-MS-Analyse der vier Substanzen war auf Grund zu vieler Störsubstanzen in der Inkubationslösung nicht erfolgreich verlaufen.
3. Eine Anreinigung der Homospermidin-umsetzenden Enzyme aus Wurzelrohextrakten von *E. cannabinum* und *S. vernalis* erfolgte über FPLC. Dabei wurden drei Säulenmaterialien und zwei verschiedene Puffergradienten verwendet. An das Phenylsepharose-Material haben die Homospermidin-umsetzenden Enzyme nicht gebunden. An die Hydroxylapatit- und der DEAE- Fractogel-Säule wurden die Homospermidin-umsetzenden Enzyme gebunden. Es wurde eine Trennung von zwei Produkt-bildenden Enzymaktivitäten bei *E. cannabinum* erreicht.
4. Neben den biochemischen Techniken zur Identifizierung des Homospermidin-umsetzenden Enzyms in den beiden PA-Pflanzen wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Mit Hilfe von degenerierten Primern, die durch ein Alignment von bekannten CAO-Sequenzen entworfen wurden, konnte eine CAO-homologe Nukleinsäuresequenz in *S. vernalis* und *E. cannabinum* identifiziert werden. Durch anschließende RACE-Techniken wurden die fehlenden 3'- und 5'-Enden identifiziert. Dabei wurden insgesamt drei CAO-homologe Nukleinsäuresequenzen aus *S. vernalis* (SVAO1, SVAO2 und SVAO3) und eine CAO-homologe Nukleinsäuresequenz aus *E. cannabinum* (ECAO1) identifiziert. Zusätzlich wurde ein 3'-Ende einer CAO-homologen Sequenz in *E. cannabinum* gefunden. Die vier neuen CAO-homologen Sequenzen wurden mit Computerprogrammen analysiert. Sie zeigten die für CAOs charakteristischen Merkmale auf. Es ist jeweils eine Signalpeptidsequenz vorhanden. Sie besitzen eine Molekülmasse für eine Untereinheit von 79,7 bis 81,7 kDa. Es wurden zwei bis vier Glykosylierungsstellen vorhergesagt. Die Sequenzen weisen die hochkonservierte Sequenz des aktiven Zentrums Asn, Tyr, Asp/Glu von CAOs auf. Auch konnten die drei konservierten Histidinreste, die als Kupfer-Liganden im aktiven Zentrum von CAOs fungieren und der konservierte Asparaginsäurerest, der als Base während des Redoxzykluses bei der Substratoxidation dient, identifiziert werden.

5. Zur Etablierung einer Positivkontrolle wurde die CAO aus *Pisum sativum* kloniert. Bei der heterologen Expression in *E. coli* konnte kein Protein und auch keine Aktivität nachgewiesen werden.
6. Da keine Expression bei der CAO aus *P. sativum* in *E. coli* nachgewiesen wurde und diese CAO erfolgreich in *Pichia pastoris* exprimiert worden war [Koyanagi et al., 2000], wurde das Hefeexpressionssystem *P. pastoris* zur Expression dieser CAO am Institut etabliert. Die Erkenntnisse sollten anschließend auf die CAO-homologen Sequenzen von *S. vernalis* und *E. cannabinum* angewendet werden. Es war keine Expression oder keine Aktivität bei der CAO aus *P. sativum* nachweisbar.
7. Die Klonierung und heterologe Expression der SVAO1 und SVAO2 (mit und ohne Signalpeptidsequenz) in *E. coli* führte zu unlöslichen Proteinaggregaten, den Inclusion-bodies. Es wurden mehrere Strategien verfolgt, um aktives Protein zu erhalten. Die SVAO1 ohne Signalpeptidsequenz ließ sich durch Solubilisierung und nachfolgender Dialyse in eine aktive Konformation zurückbringen. Bei einem Aktivitätstest konnte mit Putrescin als Substrat ein Umsatz gemessen werden. Die SVAO2 konnte solubilisiert werden, aber fiel während der Dialyse im Dialyseschlauch aus. Es wurde lösliches SVAO1-Protein (ohne Signalpeptidsequenz) durch eine Coexpression mit Chaperonen der Hsp70-Familie erhalten. Aber es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Auch wurde das eukaryotische Expressionssystem *P. pastoris* verwendet, da dieses eukaryotische posttranslationale Modifizierungen mit Proteinen durchführen kann. Bei einer Klonierung und heterologen Expression der SVAO1 mit Signalpeptidsequenz in *P. pastoris* wurden keine Expression und keine Aktivität gemessen. Ein Problem bei der Hefe-Expression war der Zellaufbruch. Nur eine French-Press konnte die harte Zellwand der Hefe zerstören.
8. Es musste ein einfacher und empfindlicher Aktivitätstest für eine CAO etabliert werden. Dieser wurde während der gesamten Arbeit ständig variiert und lag auch zum Schluss noch nicht vollständig optimierte vor. Es kam ein radioaktiver Aktivitätstest zur Anwendung. Während der Inkubation wurden 0,7 U/μl Catalase, 0,1 U/μl Alkoholdehydrogenase und 1 mM NADH standardmäßig zugesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Nach der Inkubation wurden Aliquots des Inkubationsansatzes auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und die Platte in einem Fließmittel entwickelt. Die Messung erfolgte über das RITA-System. Bei dem heterolog exprimierten SVAO-Protein zeigte sich, dass eine hohe Sauerstoffversorgung während der Inkubation notwendig war.
Erfolgreich erwies sich auch ein Nachweis von Chinonproteinen über eine Redoxfärbung.

9. Um den Ort der Transkription der drei neu identifizierten CAO-homologen Sequenzen von *S. vernalis* nachzuweisen, wurden RT-Reaktionen durchgeführt. Mit Expressionsprimern konnte die SVAO1- und die SVAO2-Transkription in den Wurzeln der Sterilkulturpflanzen von *S. vernalis* nachgewiesen werden. Bei einer *S. vernalis*-Wildpflanze wurden als Transkriptionsort die Knospe bei der SVAO1 und die Wurzel bei der SVAO2 identifiziert. Ein anderes Bild zeigten neue genspezifische Primer. Bei der Transkription der drei SVAO-Sequenzen waren keine gewebespezifischen Unterschiede bei der Wildpflanze nachzuweisen.
10. Bei den drei CAO-homologen Sequenzen aus *S. vernalis* wurde jeweils eine Signalpeptidsequenz über Computerprogramme vorhergesagt. Mit Hilfe des Green-Fluorescent-Proteins (GFP) sollte die Lokalisation des Proteins in der Zelle untersucht werden. Dafür wurden die drei Sequenzen in den pBSK-GFP-N-Fus-Vektor kloniert und die Konstrukte mit einer Partikelkanone in *S. vernalis*- und *N. tabacum*-Blätter geschossen. Die auftretende Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Die drei Proteine von *S. vernalis* wurden in den Peroxisomen lokalisiert.
11. Bei Western-Blot-Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression der HSS in den Wurzeln von *E. cannabinum* vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängig und durch blühende Nachbarpflanzen induziert wird. Dagegen ist die HSS-Expression bei *S. vernalis*-Pflanzen während der gesamten Pflanzenentwicklung gleichstark und durchgängig vorhanden.
12. Für eine Laser-Capture-Microscopy ist eine Einbettung von pflanzlichem Material in Paraffin nötig. Diese Methode musste im Institut etabliert werden. Als geeignet für eine Einbettung in Paraffin erwiesen sich in Erde gewachsene Wurzeln. Die Wurzeln müssen im primären Zustand mit einem triarchen Leitbündel vorliegen. Die mit dem Mikrotom erhaltenen Wurzelschnitte waren nicht intakt erhalten. Die verholzten Gewebe des Zentralzylinders wurden dabei aus dem Gewebeverband gerissen. Auch eine Gesamt-RNA-Isolierung aus in Paraffin-eingebetteten Wurzeln von *S. vernalis* war nicht erfolgreich verlaufen.

7. Literaturverzeichnis

- Adolph, R.** (1991). Stoffwechsel des Putrescins, der Vorstufe von Pyrrolizidinalkaloiden, in Wurzelkulturen von *S. vulgaris*. Dissertation.
- Agostinelli, E., Belli, F., Vedova, L. D., Longu, S., Mura, A., Floris, G.** (2005). Catalytic properties and the role of copper in bovine and lentil seedling copper/quinone-containing amine oxidases: controversial opinions. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1635-1641.
- Alarcon, R. A.** (1970). Acrolein. IV. Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine. *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 365-372.
- Amani, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Floris, G., Longu, S., Mura, A., Moosavi-Nejad, S. Z., Saboury, A. A., Ahmad, F.** (2005). Comparative study of the conformational lock, dissociative thermal inactivation and stability of *Euphorbia* latex and lentil seedling amine oxidases. *The Protein Journal* 24, 183-191.
- Anderson, J. L., Frase, H., Michaelis, S., Hrycyna, C. A.** (2005). Purification, functional reconstitution, and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase Ste14p. *J. Biol. Chem.* 280, 7336-7345.
- Angelini, R., Federico, R., Mancinelli, A.** (1988). Phytochrome-mediated control of diamine oxidase level in the epicotyl of etiolated lentil (*Lens culinaris medicus*) seedlings. *Plant Physiol.* 88, 1207-1209.
- Angelini, R., Rea, G., Federico, R., D'Ovidio, R.** (1996). Spatial distribution and temporal accumulation of mRNA encoding diamine oxidase during lentil (*Lens culinaris medicus*) seedling development. *Plant Sci.* 119, 103-113.
- Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., Hänsch, R., Ober, D.** (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiol.* 136, 4037-4047.
- Averill-Bates, D. A., Agostinelli, E., Przybytkowski, E., Mondovi, B.** (1994). Aldehyde dehydrogenase and cytotoxicity of purified bovine serum amine oxidase and spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Cell Biol.* 72, 36-42.
- Azakami, H., Yamashita, M., Roh, J.-H., Suzuki, H., Kumagai, H., Murooka, Y.** (1994). Nucleotide sequence of the gene for monoamine oxidase (maoA) from *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 315-319.
- Bachrach, U., Plessner, Y. M.** (1986). A sensitive, rapid, chemiluminescence-based method for the determination of diamines and polyamines. *Anal. Biochem.* 152, 423-431.
- Bailey, J. A., Mansfield, J. W.** (1981). Phytoalexins. (Glasgow, London: Blackie).
- Bauer, M., Dietrich, C., Nowak, K., Sierralta, W. D., Papenbrock, J.** (2004). Intracellular localization of *Arabidopsis* sulfurtransferases. *Plant Physiol.* 135, 916-926.
- Bennett, T. P.** (1967). Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances. *Nature* 213, 1131-1132.
- Bergmeyer, H. J.** (1983). Oxidoreductases, Transferases. (Weinheim: VCH).
- Bilková, A., Bezáková, L., Psenák, M.** (2005). An amine oxidase in seedlings of *Papaver somniferum* L. *Biol. Plant.* 49, 389-394.
- Bird, D. A., Franceschi, V. R., Facchini, P. J.** (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell.* 15, 2626-2635.
- Birnboim, H. C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Boppré, M.** (1985). Pyrrolizidine alkaloids quantitatively regulate both scent organ morphogenesis and heromone biosynthesis in male *Cretonotos* moths. *J. Comp. Physiol.* 157A, 569-577.
- Böttcher, F., Adolph, R.-D., Hartmann, T.** (1993). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochem.* 32, 679-689.
- Böttcher, F., Ober, D., Hartmann, T.** (1994). Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Can. J. Chem.* 72, 80-85.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin, T. J.** (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Sci.* 140, 103-125.

- Bown, D., Levasseur, M., Croy, R. R., Boulter, D., Gatehouse, J. A.** (1985). Sequence of a pseudogene in the legumin gene family of pea (*Pisum sativum* L.). *Nucleic Acids Res.* 13, 4527-4538.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brazeau, B. J., Johnson, B. J., Wilmot, C. M.** (2004). Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 22-31.
- Brown, J. W., Simpson, C. G.** (1998). Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 77-95.
- Bruinenberg, P. G., Evers, M., Waterham, H. R., Kuipers, J., Arnberg, A. C., Ab, G.** (1989). Cloning and sequencing of the peroxisomal amine oxidase gene from *Hansenula polymorpha*. *Biochim. Biophys. Acta* 1008, 157-167.
- Bukau, B., Horwich, A. L.** (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Cai, D., Klinman, J. P.** (1994a). Evidence for a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in yeast copper amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 32039-32042.
- Cai, D., Klinman, J. P.** (1994b). Copper amine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization of an active enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.* 33, 7647-7653.
- Cai, D., Williams, N. K., Klinman, J. P.** (1997). Effect of metal on 2,4,5-trihydroxyphenylalanine (topa) quinone biogenesis in the *Hansenula polymorpha* copper amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 272, 19277-19281.
- Castellano, F. N., He, Z., Greenaway, F. T.** (1993). Hydroxyl radical production in the reactions of copper-containing amine oxidases with substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1157, 162-166.
- Cereghino, J. L., Gregg, J. M.** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Reviews* 24, 45-66.
- Chang, A., Hartmann, T.** (1998). Solubilization and characterization of a senecionine *N*-oxygenase from *Crotalaria scassellatii* seedlings. *Phytochem.* 49, 1859-1866.
- Chaudhuri, M. M., Ghosh, B.** (1984). Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryos. *Phytochem.* 23, 241-243.
- Chen, Z. W., Schwartz, B., Williams, N. K., Li, R., Klinman, J. P., Mathews, F. S.** (2000). Crystal structure at 2.5 Å resolution of zinc-substituted copper amine oxidase of *Hansenula polymorpha* expressed in *Escherichia coli*. *Biochem.* 39, 9709-9717.
- Chiu, Y. C., Okajima, T., Murakawa, T., Uchida, M., Taki, M., Hirota, S., Kim, M., Yamaguchi, H., Kawano, Y., Kamiya, N., Kuroda, S., Hayashi, H., Yamamoto, Y., Tanizawa, K.** (2006). Kinetic and structural studies on the catalytic role of the aspartic acid residue conserved in copper amine oxidase. *Biochem.* 45, 4105-4120.
- Choi, Y. H., Matsuzaki, R., Suzuki, S., Tanizawa, K.** (1996). Role of conserved Asn-Tyr-Asp-Tyr sequence in bacterial copper/2,4,5-trihydroxyphenylalanylquinone-containing histamine oxidase. *J. Biol. Chem.* 271, 22598-22603.
- Choi, Y. H., Matsuzaki, R., Fukui, T., Shimizu, E., Yorifuji, T., Sato, H., Ozaki, Y., Tanizawa, K.** (1995). Copper/topa quinone-containing histamine oxidase from *Arthrobacter globiformis*: Molecular cloning and sequencing, overproduction of precursor enzyme and generation of topa quinone cofactor. *J. Biol. Chem.* 270, 4712-4720.
- Cogoni, A., Piras, C., Farci, R., Mells, A., Floris, G.** (1990). *Hordeum vulgare* seedlings amine oxidase. *Plant Physiol.* 93, 818-821.
- Cogoni, A., Padiglia, A., Medda, R., Segni, P., Floris, G.** (1991). Oxidation of spermine by an amine oxidase from lentil seedlings. *Plant Physiol.* 95 (2), 477-479.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 69, 2110-2114.
- Cona, A., Federico, R., Niglio, A., Shepherd, Z., Dey, P. M.** (1993). A new and sensitive method for the assay of amine oxidase by measurement of the liberated peroxide. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 57-63.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., Tavladoraki, P.** (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant. Sci.* 11, 80-88.
- Conn, M.** (2002). *Laser Capture Microscopy*. (Amsterdam u. a.: Academic Press).

- Conner, W. E., Roach, B., Benedict, E., Meinwald, J., Eisner, T. (1990). Courtship pheromone production and body size as correlates of larval diet in males of the arctiid moth, *Utetheisa ornatrix*. J. Chem. Ecol. 16, 593.
- Coombs, N. J., Gough, A. C., Primrose, J. N. (1999). Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res. 27, e12.
- Cornea, A., Mungenast, A. (2002). Comparison of current equipment. Methods Enzymol. 356, 3-12.
- Corpillo, D., Valetti, F., Giuffrida, M. G., Conti, A., Rossi, A., Finazzi-Agro, A., Giunta, C. (2003). Induction and characterization of a novel amine oxidase from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Yeast 20, 369-379.
- de Biase, D., Agostinelli, E., de Matteis, G., Mondovi, B., Morpurgo, L. (1996). Half-of-the-sites reactivity of bovine amine oxidase. Reactivity and chemical identity of the second site. Eur. J. Biochem. 273, 93-99.
- Delhaize, E., Webb, J. (1987). Purification and characterization of diamine oxidase from clover leaves. Phytochem. 26, 641-643.
- Delis, C., Dimou, M., Flemetakis, E., Aivalakis, G., Katinakis, P. (2006). A root- and hypocotyl-specific gene coding for copper-containing amine oxidase is related to cell expansion in soybean seedlings. J. Exp. Bot. 57, 101-111.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93, 6025-6030.
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W., Honer, C. B., Hollenberg, C. P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. Yeast 7, 691-692.
- Dove, J. E., Schwartz, B., Williams, N. K., Klinman, J. P. (2000). Investigation of spectroscopic intermediates during copper-binding and TPQ formation in wild-type and active-site mutants of a copper-containing amine oxidase from yeast. Biochem. 39, 3690-3698.
- DuBois, J. L., Klinman, J. P. (2004). Methods for characterizing TPQ-containing proteins. Methods Enzymol. 378, 17-31.
- DuBois, J. L., Klinman, J. P. (2005). The nature of O₂ reactivity leading to topa quinone in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha* and its relationship to catalytic turnover. Biochem. 44, 11381-11388.
- DuBois, J. L., Klinman, J. P. (2006). Role of a strictly conserved active site tyrosine in cofactor genesis in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*. Biochem. 45, 3178-3188.
- Duff, A. P., Shepard, E. M., Langley, D. B., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M. (2006). A C-terminal disulfide bond in the copper-containing amine oxidase from pea seedlings violates the twofold symmetry of the molecular dimer. Acta Cryst. Section F 62, 1186-1173.
- Dussourd, D. E., Harvis, C. A., Meinwald, J., Eisner, T. (1991). Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88, 9224-9227.
- Dussourd, D. E., Ubik, K., Harvis, C., Resch, J., Meinwald, J., Eisner, T. (1988). Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85, 5992-5996.
- Ehmke, A., von Borstel, K., Hartmann, T. (1988). Alkaloid N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. Planta Heidelberg 176 (1), 83-90.
- Eller, M. H., Warner, A. L., Knap, H. T. (2006). Genomic organization and expression analyses of putrescine pathway genes in soybean. Plant Physiol. Biochem. 44, 49-57.
- Elmore, B. O., Bollinger, J. A., Dooley, D. M. (2002). Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. J. Biol. Inorg. Chem. 7, 565-579.
- Errera, L. (1886). Efficacité des structures défensives des plantes. B. Soc. Roy. Bot. Belg. 25, 80-99.
- Evans, P. T., Malmberg, R. L. (1989). Do Polyamines have roles in plant development? Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 235-269.
- Facchini, P. J., St-Pierre, B. (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Curr. Op. Plant Biol. 8, 657-666.

- Farnum, M., Palcic, M., Klinman, J. P.** (1986). pH dependence of deuterium isotope effects and tritium exchange in the bovine plasma amine oxidase reaction: a role for single-base catalysis in amine oxidation and imine exchange. *Biochem.* 25, 1898-1904.
- Federico, R., Angelini, R.** (1986). Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta* 167, 300-302.
- Federico, R., Angelini, R.** (1991). Polyamine catabolism in plants. (Boca Raton, Florida: CRC Press).
- Federico, R., Di, L. F., Angelini, R.** (1985). Purification of diamine oxidase from *Lens culinaris* by affinity chromatography. *Plant Sci.* 38, 9-12.
- Flink, I., Pettijohn, D. E.** (1975). Polyamines stabilise DNA folds. *Nature* 253, 62-63.
- Flores, H. E., Galston, A. W.** (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69, 701-706.
- Flores, H. E., Filner, P.** (1985). Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul.* 3, 277-291.
- Floris, G., Giartosio, A., Rinaldi, A.** (1983). Essential sulfhydryl groups in diamine oxidase from *Euphorbia characias* latex. *Arch. Biochem. Biophys.* 220, 623-627.
- Fontecave, M., Eklund, H.** (1995). Copper amine oxidase: a novel use for tyrosine. *Structure* 3, 1127-1129.
- Frebort, I., Sebela, M., Svendsen, I., Hirota, S., Endo, M., Yamauchi, O., Bellelli, A., Lemr, K., Pec, P.** (2000). Molecular mode of interaction of plant amine oxidase with the mechanism-based inhibitor 2-butyne-1,4-diamine. *Eur. J. Biochem.* 267, 1423-1433.
- Frey, M., Stettner, C., Pare, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H., Gierl, A.** (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 14801-14806.
- Fritz, R. S., Simms, E. L.** (1992). Plant resistance to herbivores and pathogens - Ecology, evolution, and genetics. (Chicago & London: University of Chicago Press).
- Frölich, C.** (1996). Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae. Dissertation.
- Frölich, C., Hartmann, T., Ober, D.** (2006). Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochem.* 67, 1493-1502.
- Frölich, C., Ober, D., Hartmann, T.** (2007). Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochem.* 68, 1026-1037.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M. W.** (2002). Genotoxic pyrrolizidine alkaloids — Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 948-964.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M. W.** (2004). Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab. Rev.* 36, 1-55.
- Galston, A. W., Sawhney, R. K.** (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94, 406-410.
- Gierl, A., Frey, M.** (2001). Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* 213, 493-498.
- Godfrey, T. E., Kim, S. H., Chavira, M., Ruff, D. W., Warren, R. S., Gray, J. W., Jensen, R. H.** (2000). Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 2, 84-91.
- Grant, K. L., Klinman, J. P.** (1989). Evidence that both protium and deuterium undergo significant tunneling in the reaction catalyzed by bovine serum amine oxidase. *Biochem.* 28, 6597-6605.
- Graser, G., Hartmann, T.** (1997). Biosynthetic incorporation of the aminobutyl group of spermidine into pyrrolizidine alkaloids. *Phytochem.* 45, 1591-1595.
- Graser, G., Hartmann, T.** (2000). Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta Berlin* 211, 239-245.
- Guvenilir, Y. A., Deveci, N.** (1996). The isolation and purification of diamine oxidase of pea seedlings and pig liver. *Appl. Biochem. Biotech.* 56, 235-241.
- Hagiwara, M., Soeda, M., Suzuki, Y.** (1994). Purification and characterization of diamine oxidase from *Arachis hypogea* seedlings. *Plant Physiol.* 144, 12-16.
- Hancock, K., Tsang, V. C.** (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133, 157-162.

- Harborne, J. B.** (1993). Introduction to ecological biochemistry. (London: Academic Press).
- Harms, R.** (2003). Eigenschaften rekomanter *sym*-Homospermidinsynthese und Desoxyhypusinsynthese aus *Senecio vernalis* (Dissertation).
- Hartmann, C., Klinman, J. P.** (1987). Reductive trapping of substrate to bovine plasma amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 262, 962-965.
- Hartmann, T.** (1985). Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels - Principles of plant secondary metabolism. *Plant Syst. Evol.* 150, 15-34.
- Hartmann, T.** (1999). Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta Berlin* 207, 483-495.
- Hartmann, T., Zimmer, M.** (1986). Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Plant Physiol.* 122, 67-80.
- Hartmann, T., Toppel, G.** (1987). Senecionine *N*-Oxide the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochem.* 26 (6), 1639-1644.
- Hartmann, T., Witte, L.** (1995). Chemistry, biology and chemoeology of the pyrrolizidine alkaloids. In *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, S.W. Pelletier, ed (Oxford: Verlag Pergamon), pp. 155 ff.
- Hartmann, T., Dierich, B.** (1998). Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: Biological need or coincidence? *Planta Berlin* 206, 443-451.
- Hartmann, T., Ober, D.** (2000a). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top. Curr. Chem.* 209, 208-243.
- Hartmann, T., Ober, D.** (2000b). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In *Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids*, F.J. Leeper and J.C. Vederas, eds (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 209.
- Hartmann, T., Ober, D.** (2003). Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen. *Carolo-Wilhelmina* 1, 26-32.
- Hartmann, T., Sander, H., Adolph, R. D., Toppel, G.** (1988). Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta Heidelberg* 175, 82-90.
- Hartmann, T., Ehmke, A., Eilert, U., von Borstel, K., Theuring, C.** (1989). Sites of synthesis translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta Heidelberg* 177 (1), 98-107.
- Hashimoto, T., Yamada, H.** (1994). Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 257-285.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y., Yamada, Y.** (1986). Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *Plant Physiol.* 124 (1-2), 61-76.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y., Yamada, Y.** (1989a). Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus* II. Incorporation of labeled precursors. *Planta Heidelberg* 178 (1), 131-137.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y., Yamada, Y.** (1989b). Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus* I. Biochemical studies. *Planta Heidelberg* 178 (1), 123-130.
- Hashimoto, T., Mitani, A., Yamada, Y.** (1990). Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol.* 93, 216-221.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y.** (1998). Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol.* 39, 73-79.
- Haslam, E.** (1986). Secondary metabolism - facts and fiction. *Nat. Prod. Rep.* 3, 217-249.
- Heim, W. G., Sykes, K. A., Hildreth, S. B., Sun, J., Lu, R.-H., Jelesko, J. G.** (2007). Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript. *Phytochem.* 68, 454-463.
- Heim, W. G., Jelesko, J. G.** (2004). Association of diamine oxidase and S-adenosylhomocysteine hydrolase in *Nicotiana tabacum* extracts. *Plant Mol. Biol.* 56, 299-308.
- Hill, J. M.** (1972). Diamine oxidase (Pea seedling). *Methods Enzymol.* 11, 730-735.
- Hochuli, E., Dobeli, H., Schacher, A.** (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411, 177-184.
- Hogdall, E. V., Houen, G., Borre, M., Bundgaard, J. R., Larsson, L.-I., Vuust, J.** (1998). Structure and tissue-specific expression of genes encoding bovine copper amine oxidases. *FEBS* 251, 320-328.

- Horvath, A., Riezman, H.** (1994). Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1305-1310.
- Houen, G., Bock, K., Jensen, A. L.** (1994). HPLC and NMR investigation of the serum amine oxidase catalyzed oxidation of polyamines. *Acta Chem. Scand.* 48, 52-60.
- Houen, G., Struve, C., Sondergaard, R., Friis, T., Anthoni, U., Nielsen, P. H., Christophersen, C., Petersen, B. O., Duus, J. O.** (2005). Substrate specificity of the bovine serum amine oxidase and in situ characterisation of aminoaldehydes by NMR spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 3783-3796.
- Ish-Horowicz, D., Burke, J. F.** (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9, 2989-2998.
- Janes, S. M., Klinman, J. P.** (1991). An investigation of bovine serum amine oxidase active site stoichiometry: evidence for an aminotransferase mechanism involving two carbonyl cofactors per enzyme dimer. *Biochem.* 30, 4599-4605.
- Janes, S. M., Mu, D., Wemmer, D., Smith, A. J., Kaur, S., Maltby, D., Burlingame, A. L., Klinman, J. P.** (1990). A new redox cofactor in eukaryotic enzymes 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science Washington DC* 248 (4958), 981-987.
- Janes, S. M., Palcic, M. M., Scaman, C. H., Smith, A. J., Brown, D. E., Dooley, D. M., Mure, M., Klinman, J. P.** (1992). Identification of topaquinone and its consensus sequence in copper amine oxidases. *Biochem.* 31, 12147-12154.
- Joseph, P., Srivastava, S. K.** (1995). Photoregulation of diamine oxidase from pea seedlings. *Plant Physiol.* 146, 108-114.
- Jung, S. T., Kim, M. S., Seo, J. Y., Kim, H. C., Kim, Y.** (2003). Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from *Escherichia coli* Inclusion-bodies. *Protein Expr. Purif.* 31, 240-246.
- Kelly, H. A., Robins, D. J.** (1988). Evidence for an immonium ion intermediate in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 5, 329-330.
- Kerk, N. M., Ceserani, T., Tausta, S. L., Sussex, I. M., Nelson, T. M.** (2003). Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiol.* 132, 27-35.
- Kerner von Marilaun, A.** (1890). *Pflanzenleben 1 & 2.* (Leipzig, Wien: Verlag des Bibliographischen Instituts).
- Khan, H. A., Robins, D. J.** (1981a). Pyrrolizidine alkaloids: Evidence for N-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutane (homospermidine) as an intermediate in retronecine biosynthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 554-556.
- Khan, H. A., Robins, D. J.** (1981b). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis; Incorporation of ¹³C-labelled putrescines into retronecine. *J. C. S. Chem. Comm.*, 146-147.
- Khan, H. A., Robins, D. J.** (1985). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis synthesis of carbon-14-labeled homospermidines and their incorporation into retronecine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (4), 819-824.
- Kim, M., Okajima, T., Kishishita, S., Yoshimura, M., Kawamori, A., Tanizawa, K., Yamaguchi, H.** (2002). X-ray snapshots of quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase. *Nat. Struct. Biol.* 9, 591-596.
- Kim, M. S., Kim, S. S., Jung, S. T., Park, J. Y., Yoo, H. W., Ko, J., Csiszar, K., Choi, S. Y., Kim, Y.** (2003). Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4. *J. Biol. Chem.* 278, 52071-52074.
- Kishishita, S. i., Okajima, T., Kim, M., Yamaguchi, H., Hirota, S., Suzuki, S., Kuroda, S. i., Tanizawa, K., Mure, M.** (2003). Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1041-1055.
- Klinman, J. P.** (1996). New quinocofactors in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 271, 27189-27192.
- Klinman, J. P., Mu, D.** (1994). Quinocofactors in biology. *Annu Rev Biochem* 63, 299-344.
- Koprek, T., Hänsch, R., Nerlich, A., Mendel, R. R., Schulze, J.** (1996). Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Sci.* 119, 79-91.
- Koyanagi, T., Matsumura, K., Kuroda, S., Tanizawa, K.** (2000). Molecular cloning and heterologous expression of pea seedling copper amine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 717-722.

- Kumar, V., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Harvey, I., McGuirl, M. A., Wilce, M. C., Zubak, V. M. (1996). Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* 4, 943-955.
- Kunec, E. K., Robins, D. J. (1989). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis synthesis of tritium-labelled trachelanthamidine and isoretronecanol and their incorporation into three pyrrolizidine bases necines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (8), 1437-1442.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laurenzi, M., Tipping, A. J., Marcus, S. E., Knox, J. P., Federico, R., Angelini, R., McPherson, M. J. (2001). Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* 214, 37-45.
- Lee, Y., Sayre, L. M. (1998). Reaffirmation that metabolism of polyamines by bovine plasma amine oxidase occurs strictly at the primary amino termini. *J. Biol. Chem.* 273, 19490-19494.
- Lee, Y., Shepard, E., Smith, J., Dooley, D. M., Sayre, L. M. (2001). Catalytic turnover of substrate benzylamines by the quinone-dependent plasma amine oxidase leads to H₂O₂-dependent inactivation: evidence for generation of a cofactor-derived benzoxazole. *Biochem.* 40, 822-829.
- Li, R., Klinman, J. P., Mathews, F. S. (1998). Copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*: The crystal structure determined at 2.4 Å resolution reveals the active conformation. *Structure* 6, 293-307.
- Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., d'Anjou, M., Daugulis, A. J., Yang, D. S., Hew, C. L. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein. Expr. Purif.* 21, 438-445.
- Linder, S., Schliwa, M., Kube-Granderath, E. (1996). Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques* 20, 980-982.
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H. M., Boppre, M., Hartmann, T. (1997). The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur. J. Biochem.* 245, 626-636.
- Longu, S., Mura, A., Padigla, A., Medda, R., Floris, G. (2005a). Mechanism-based inactivators of plant copper/quinone containing amine oxidases. *Phytochem.* 66, 1751-1758.
- Longu, S., Padigla, A., Pedersen, J. Z., Finazzi Agro, A., Mura, A., Maccioni, P., Floris, G., Medda, R. (2005b). Nitric oxide covalently labels a 6-hydroxydopa-derived free radical intermediate in the catalytic cycle of copper/quinone-containing amine oxidase from lentil seedlings. *Biol. Chem.* 386, 25-31.
- Luckner, M. (1990). Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. (Jena: G. Fischer).
- Lunelli, M., Di Paolo, M. L., Biadene, M., Calderone, V., Battistutta, R., Scarpa, M., Rigo, A., Zanotti, G. (2005). Crystal structure of amine oxidase from bovine serum. *J. Mol. Biol.* 346, 991-1004.
- Maccarrone, M., Rossi, A., Avigliano, L., Finazzi, A. A. (1991). Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedlings under different growth conditions. *Plant Sci.* 79, 51-56.
- Macholan, I., Haubrova, J. (1976). Isolation and some characteristics of diamine oxidase from etiolated pea seedlings. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 41, 2987-2993.
- Mann, P. J. (1955). Purification and properties of the amine oxidase of pea seedlings. *Biochem. J.* 59, 609-620.
- Matsuda, H., Suzuki, Y. (1981). Purification and properties of the diamine oxidase from *Vicia faba* leaves. *Plant Cell Physiol.* 22, 737-746.
- Matsuzaki, R., Tanizawa, K. (1998). Exploring a channel to the active site of copper/topaquinone-containing phenylethylamine oxidase by chemical modification and site-specific mutagenesis. *Biochem.* 37, 13947-13957.
- Matsuzaki, R., Fukui, T., Sato, H., Ozaki, Y., Tanizawa, K. (1994). Generation of the topa quinone cofactor in bacterial monoamine oxidase by cupric ion-dependent autooxidation of a specific tyrosyl residue. *FEBS Lett.* 351, 360-364.
- Matsuzaki, R., Suzuki, S., Yamaguchi, K., Fukui, T., Tanizawa, K. (1995). Spectroscopic studies on the mechanism of the topa quinone generation in bacterial monoamine oxidase. *Biochem.* 34, 4524-4530.

- Mattocks, A. R.** (1986). Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. (London: Academic Press).
- McGuirl, M. A., McCahon, C. D., McKeown, K. A., Dooley, D. M.** (1994). Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant Physiol.* 106, 1205-1211.
- McLauchlan, W. R., McKee, R. A., Evans, D. M.** (1993). The purification and immunocharacterisation of N-methylputrescine oxidase from transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* L. cv SC58. *Planta Heidelberg* 191, 440-445.
- Medda, R., Padiglia, A., Floris, G.** (1995a). Plant copper-amine oxidases. *Phytochem.* 39, 1-9.
- Medda, R., Padiglia, A., Pedersen, J. Z., Rotilio, G., Agro, A. F., Floris, G.** (1995b). The reaction mechanism of copper amine oxidase: Detection of intermediates by the use of substrates and inhibitors. *Biochem.* 34, 16375-16381.
- Medda, R., Padigla, A., Bellelli, A., Sarti, P., Santanchè, S., Finazzi Agro, A., Floris, G.** (1998). Intermediates in the catalytic cycle of lentil (*Lens esculenta*) seedling copper-containing amine oxidase. *Biochem. J.* 332, 431-437.
- Medda, R., Mura, A., Longu, S., Anedda, R., Padigla, A., Casu, M., Floris, G.** (2006). An unexpected formation of the spectroscopic Cu^I-semiquinone radical by xenon-induced self-catalysis of a copper quinonprotein. *Biochimie* 88, 827-835.
- Mills, S. A., Klinman, J. P.** (2000). Evidence against reduction of Cu²⁺ to Cu⁺ during dioxygen activation in copper amine oxidase from yeast. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9897-9904.
- Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M., Tamaki, E.** (1972). N-methylputrescine oxidase from tobacco roots. *Phytochem.* 11, 2757-2762.
- Moeller, S. G., McPherson, M. J.** (1998). Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* atao1 gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant J.* 13, 781-791.
- Mogk, A., Mayer, M. P., Deuerling, E.** (2001). Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit* 3, 182-192.
- Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T., Ober, D.** (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase. *Plant Physiol.* 130, 47-57.
- Mondovi, B., Rotilio, G., Finazzi-Agrò, A., Costa, M. T.** (1967). Diamine oxidase inactivation by hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 132, 521-523.
- Mothes, K.** (1955). Physiology of alkaloids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 6, 393-432.
- Mu, D., Janes, S. M., Smith, A. J., Brown, D. E., Dooley, D. M., Klinman, J. P.** (1992). Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *J. Biol. Chem.* 267 (12), 7979-7982.
- Mu, D., Medzihradsky, K. F., Adams, G. W., Mayer, P., Hines, W. M., Burlingame, A. L., Smith, A. J., Cai, D., Klinman, J. P.** (1994). Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 9926-9932.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology* 155, 335-350.
- Mura, A., Padigla, A., Medda, R., Pintus, F., Finazzi Agro, A., Floris, G.** (2006). Properties of copper-free pig kidney amine oxidase: Role of topa quinone. *FEBS Lett.* 580, 4317-4324.
- Mura, A., Anedda, R., Pintus, F., Casu, M., Padigla, A., Floris, G., Medda, R.** (2007). An important lysine residue in copper/quinone-containing amine oxidases. *FEBS Lett.* , 1-11.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Mure, M.** (2004). Tyrosine-derived quinone cofactors. *Acc. Chem. Res.* 37, 131-139.
- Mure, M., Klinman, J. P.** (1995). Model studies of topaquinone-dependent amine oxidases. 2. Characterization of reaction intermediates and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8707-8718.
- Mure, M., Mills, S. A., Klinman, J. P.** (2002). Catalytic mechanism of the topa quinone containing copper amine oxidases. *Biochem.* 41, 9269-9278.

- Mure, M., Brown, D. E., Saysell, C., Rogers, M. S., Wilmot, C. M., Kurtis, C. R., McPherson, M. J., Phillips, S. E., Knowles, P. F., Dooley, D. M. (2005). Role of the interactions between the active site base and the substrate Schiff base in amine oxidase catalysis. Evidence from structural and spectroscopic studies of the 2-hydrazinopyridine adduct of *Escherichia coli* amine oxidase. *Biochem.* 44, 1568-1582.
- Murray, J. M., Kurtis, C. R., Tambyrajah, W., Saysell, C. G., Wilmot, C. M., Parsons, M. R., Phillips, S. E., Knowles, P. F., McPherson, M. J. (2001). Conserved tyrosine-369 in the active site of *Escherichia coli* copper amine oxidase is not essential. *Biochem.* 40, 12808-12818.
- Nag, S., Saha, K., Choudhuri, M. A. (2000). A rapid and sensitive assay method for measuring amine oxidase based on hydrogen peroxide-titanium complex formation. *Plant Sci.* 157, 157-163.
- Naik, B. I., Goswami, R. G., Srivastava, S. K. (1981). A rapid and sensitive colorimetric assay of amine oxidase. *Anal. Biochem.* 111 (1), 146-148.
- Nakamura, N., Matsuzaki, R., Choi, Y.-H., Tanizawa, K., Sanders-Loehr, J. (1996). Biosynthesis of topa quinone cofactor in bacterial amine oxidases. Solvent origin of C-2 oxygen determined by Raman spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 271, 4718-4724.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A., Eisenhaber, B. (2003). Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *J. Mol. Biol.* 328, 567-579.
- Nowak, K., Luniak, N., Meyer, S., Schulze, J., Mendel, R. R., Hänsch, R. (2004a). Fluorescent proteins in poplar: a useful tool to study promoter function and protein localization. *Plant Biol. (Stuttg)* 6, 65-73.
- Nowak, K., Luniak, N., Witt, C., Wustefeld, Y., Wachter, A., Mendel, R. R., Hänsch, R. (2004b). Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant Cell Physiol.* 45, 1889-1894.
- Ober, D. (1997). Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Dissertation.
- Ober, D. (2003). Chemical ecology of alkaloids exemplified with the pyrrolizidines. *Recent advances in phytochemistry*, S. 203-230.
- Ober, D. (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* 10, 444-449.
- Ober, D., Hartmann, T. (1999a). Deoxyhypusine synthase from tobacco: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 274, 32040-32047.
- Ober, D., Hartmann, T. (1999b). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14777-14782.
- Ober, D., Hartmann, T. (2000). Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* 44, 445-450.
- Ober, D., Gibas, L., Witte, L., Hartmann, T. (2003a). Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase. *Phytochem.* 62, 339-344.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L., Hartmann, T. (2003b). Molecular evolution by change of function. Alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *J. Biol. Chem.* 278, 12805-12812.
- Okajima, T., Kishishita, S. i., Chiu, Y.-C., Murakawa, T., Kim, M., Yamaguchi, H., Hirota, S., Kuroda, S. i., Tanizawa, K. (2005). Reinvestigation of metal ion specificity for quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase. *Biochem.* 44, 12041-12048.
- Okuyama, T., Kobayashi, Y. (1961). Determination of diamine oxidase activity by liquid scintillation counting. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 242-250.
- Ott, K. H., Kwagh, J. G., Stockton, G. W., Sidorov, V., Kakefuda, G. (1996). Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase. *J. Mol. Biol.* 263, 359-368.

- Padigla, A., Cogoni, A., Floris, G.** (1991). Characterization of amine oxidases from *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* and *Cicer*. *Phytochem.* 30, 3895-3897.
- Padigla, A., Medda, R., Lorrai, A., Murgia, B., Pedersen, J. Z., Agro, A. F., Floris, G.** (1998). Characterization of *Euphorbia characias* latex amine oxidase. *Plant Physiol.* 117, 1363-1371.
- Padigla, A., Medda, R., Bellelli, A., Agostinelli, E., Morpurgo, L., Mondovi, B., Finazzi Agro, A., Floris, G.** (2001a). The reductive and oxidative half-reaction and the role of copper ions in plant and mammalian copper-amine oxidases. *Eur. J. Inorg. Chem.* I, 35-42.
- Padigla, A., Medda, R., Bellelli, A., Agostinelli, E., Morpurgo, L., Mondovi, B., Agro, A. F., Floris, G.** (2001b). The reductive and oxidative half-reactions and the role of copper ions in plant and mammalian copper-amine oxidases. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 30-42.
- Padigla, A., Floris, G., Longu, S., Schinina, E. M., Pedersen, J. Z., Finazzi Agro, A., de Angelis, F., Medda, R.** (2004). Inhibition of lentil copper/TPQ amine oxidase by the mechanism-based inhibitor derived from tyramine. *Biol. Chem.* 385, 323-329.
- Padiglia, A., Medda, R., Scanu, T., Longu, S., Rossi, A., Floris, G.** (2002). Structure and nucleotide sequence of *Euphorbia characias* copper/TPQ-containing amine oxidase gene. *J. Protein Chem.* 21, 435-441.
- Padiglia, A., Medda, R., Pedersen, J. Z., Lorrai, A., Pec, P., Frebort, I., Floris, G.** (1998). Inhibitors of plant copper amine oxidases. *J. Enzyme Inhibition* 13, 311-325.
- Palavon, N., Galston, A. W.** (1982). Polyamine biosynthesis and titer during various developmental stages of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 55, 438-446.
- Panicot, M., Minguet, E. G., Ferando, A., Alcázar, R., Blázquez, M. A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C., Tiburcio, A. F.** (2002). A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in arabidopsis. *The Plant Cell* 14, 2539-2551.
- Parsons, M. R., Convery, M. A., Wilmot, C. M., Yadav, K. D., Blakeley, V., Corner, A. S., Phillips, S. E., McPherson, M. J., Knowles, P. F.** (1995). Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure* 3, 1171-1184.
- Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A.** (2005). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiol.*
- Pasteels, J. M.** (1988). Defensive glands and secretions as taxonomical tools in the Chrysomelidae. *Entomograph* 6, 423-432.
- Paz, M. A., Fluckiger, R., Boak, A., Kagan, H. M., Gallop, P. M.** (1991). Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *J. Biol. Chem.* 266, 689-692.
- Pelser, P. B., de Vos, H., Theuring, C., Beuerle, T., Vrieling, K., Hartmann, T.** (2005). Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section *jacobaea* (Asteraceae). *Phytochem.* 66, 1285-1295.
- Petriv, O. I., Tang, L., Titorenko, V. I., Rachubinski, R. A.** (2004). A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J. Mol. Biol.* 341, 119-134.
- Pichersky, E., Gang, D. R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5, 439-445.
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Federico, R., Mondovi, B., Morpurgo, L.** (2004). Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products. *Eur. J. Biochem.* 271, 146-152.
- Pietrangeli, P., Nocera, R., Mondovi, Morpurgo, L.** (2003). Is the catalytic mechanism of bacteria, plant, and mammal copper-TPQ amine oxidases identical? *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 152-156.
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Fattibene, P., Wang, X., Mondovi, B., Morpurgo, L.** (2000). Modulation of bovine serum amine oxidase activity by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 267, 174-178.
- Podobová, E., Kovács, P., Psenák, M.** (1994). Amine oxidase in developing poppy seedlings, *Papaver somniferum* L. *Biologia, Bratislava* 49, 125-130.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Prabhakar, R., Siegbahn, P. E.** (2004). A theoretical study of the mechanism for the biogenesis of cofactor topaquinone in copper amine oxidases. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3996-4006.

- Qiao, C., Ling, K.-Q., Shepard, E. M., Dooley, D. M., Sayre, L. M.** (2006). Mechanism-based cofactor derivatization of a copper amine oxidase by a branched primary amine recruits the oxidase activity of the enzyme to turn inactivator into substrate. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6206-6219.
- Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D.** (1999). High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 787-794.
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., O'Halloran, T. V.** (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808.
- Rea, G., Metoui, O., Infantino, A., Federico, R., Angelini, R.** (2002). Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiol.* 128, 865-875.
- Rea, G., Laurenzi, M., Tranquilli, E., D'Ovidio, R., Federico, R., Angelini, R.** (1998). Developmentally and wound-regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amine oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Lett.* 437, 177-182.
- Redmond, J. W., Tseng, A.** (1979). High-pressure liquid chromatography determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.* 170, 479-481.
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A., Ober, D.** (2004). Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell* 16, 2772-2784.
- Rinaldi, A., Floris, G., Finazzi-Agro, A.** (1982). Purification and properties of diamine oxidase from *Euphorbia latex*. *Eur. J. Biochem.* 127, 417-422.
- Rinaldi, A., Giartosio, A., Floris, G., Medda, R., Finazzi Agro, A.** (1984). Lentil seedlings amine oxidase: preparation and properties of the copper-free enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 242-249.
- Rizk, A. F. M.** (1991). Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. (Boca Raton: CRC Press).
- Robins, D. J.** (1982). A biogenetically patterned synthesis of the pyrrolizidine alkaloid: Trachelanthamidine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1289-1290.
- Robins, D. J., Sweeney, J. R.** (1979). Pyrrolizidine alkaloids: evidence for the involvement of spermidine and spermine in the biosynthesis of retronecine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 120-121.
- Robins, D. J., Sweeney, J. R.** (1981). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. Incorporation of ^{14}C -labelled precursors into retronecine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3083-3086.
- Roh, J. H., Suzuki, H., Azakami, H., Yamashita, M., Murooka, Y., Kumagai, H.** (1994). Purification, characterization, and crystallization of monoamine oxidase from *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1652-1656.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., Clare, J. J.** (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423-488.
- Romeis, B.** (1989). *Mikroskopische Technik*. (München, Wien: Urban und Schwarzenberg).
- Rossi, A., Petruzzelli, R., Agro, A. F.** (1992). cDNA-derived amino-acid sequence of lentil seedlings' amine oxidase. *FEBS Lett.* 301, 253-257.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., Jaenicke, R.** (1997). Folding proteins. In *Protein function - a practical approach*, T.E. Creighton, ed (Oxford: IRL Press at Oxford Univ. Press), pp. 334 S.
- Ruggiero, C. E., Smith, J. A., Tanizawa, K., Dooley, D. M.** (1997). Mechanistic studies of topa quinone biogenesis in phenylethylamine oxidase. *Biochem.* 36, 1953-1959.
- Ruiz-Manzano, J., Manterola, J. M., Gamboa, F., Calatrava, A., Monso, E., Martinez, C., Ausina, V.** (2000). Detection of *mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. *Chest* 118, 648-655.
- Sachs, J.** (1893). *Lehrbuch der Botanik*. (Leipzig: Engelmann, W.).
- Salnikova, A. B., Kryndushkin, D. S., Smirnov, V. N., Kushnirov, V. V., Ter-Avanesyan, M. D.** (2005). Nonsense suppression in yeast cells overproducing Sup35 (eRF3) is caused by its non-heritable amyloids. *J. Biol. Chem.* 280, 8808-8812.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning - A laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samuels, N. M., Klinman, J. P.** (2005). 2,4,5-Trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha* with the alternate metal nickel. *Biochem.* 44, 14308-14317.
- Samuels, N. M., Klinman, J. P.** (2006). Investigation of cu(I)-dependent 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in *Hansenula polymorpha* amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 281, 21114-21118.
- Sander, H., Hartmann, T.** (1989). Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 18, 19-31.
- Santane, A., Simola, L. K.** (1994). Catabolism of putrescine and spermidine in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 90, 125-129.
- Schauer, S., Chaturvedi, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W. D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thomann, H. U., Heinz, D. W., Inokuchi, H., Soll, D., Jahn, D.** (2002). *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. Trapping the thioester intermediate. *J. Biol. Chem.* 277, 48657-48663.
- Schneider, D.** (1987). Perspectives in chemoreception and behavior, R.F. Chapman, E.A. Bernays, J.G. Stoffolano, eds (Heidelberg: Springer), pp. 123.
- Schofield, D. A., Westwater, C., Paulling, E. E., Nicholas, P. J., Balish, E.** (2003). Detection of *Candida albicans* mRNA from formalin-fixed, paraffin-embedded mouse tissues by nested reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 831-834.
- Schultz, M. C.** (1999). Chromatin assembly in yeast cell-free extracts. *Methods* 17, 161-172.
- Scoccianti, V., Torrigiani, P., Bagni, N.** (1991). Occurrence of diamine oxidase activity in protoplasts and isolated mitochondria of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.* 138, 752-756.
- Scoccianti, V., Torrigiani, P., Bagni, N.** (1993). Putrescine oxidation in microbodies of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol. Biochem.* 31, 567-571.
- Sebela, M., Luhova, L., Frebort, I., Faulhammer, H. G., Hirota, S., Zajoncova, L., Stuzka, V., Pec, P.** (1998). Analysis of the active sites of copper/topa quinone-containing amine oxidases from *Lathyrus odoratus* and *L. sativus* seedlings. *Phytochem. Anal.* 9, 211-222.
- Seemann, M., Wegner, P., Schunemann, V., Bui, B. T., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A. X., Rohmer, M.** (2005). Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 131-137.
- Sharmin, S., Sakata, K., Kashiwagi, K., Ueda, S., Iwasaki, S., Shirahata, A., Igarashi, K.** (2001). Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 228-235.
- Shepard, E. M., Dooley, D. M.** (2006). Intramolecular electrontransfer rate between active-site copper and TPQ in *Arthrobacter globiformis* amine oxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 1039-1048.
- Shepard, E. M., Smith, J., Elmore, B. O., Kuchar, J. A., Sayre, L. M., Dooley, D. M.** (2002). Towards the development of selective amine oxidase inhibitors. Mechanism-based inhibition of six copper containing amine oxidases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3645-3658.
- Shuman, S.** (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269, 32678-32684.
- Simpson, C. G., Clark, G., Davidson, D., Smith, P., Brown, J. W.** (1996). Mutation of putative branchpoint consensus sequences in plant introns reduces splicing efficiency. *Plant J.* 9, 369-380.
- Slocum, R. D., Furey, M. J. d.** (1991). Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. *Planta* 183, 443-450.
- Slocum, R. D., Kaur-Sawhney, R., Galston, A. W.** (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 283-303.
- Smith, T. A.** (1970). Polyamine oxidase in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1452-1456.
- Smith, T. A.** (1985). Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 117-143.
- Srivastava, S. K., Smith, T. A.** (1982). The effect of some oligoamines and guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochem.* 21, 997-1008.

- Stahl, E.** (1967). Dünnschichtchromatographie - Ein Labroatoriumshandbuch. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag).
- Stanta, G., Schneider, C.** (1991). RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *Biotechniques* 11, 304-308.
- Steinebach, V., de Vries, S., Duine, J. A.** (1996). Intermediates in the catalytic cycle of copper-quinoprotein amine oxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 5580-5588.
- St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A., De Luca, V.** (1999). Multicellular compartmentation of *catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* 11, 887-900.
- Studier, F. W.** (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219 (1), 37-44.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 (1), 113-130.
- Suzuki, S., Sakurai, T., Nakahara, A.** (1986). Roles of the two copper ions in bovine serum amine oxidase. *Biochem.* 25, 339-341.
- Szutowicz, A., Kobes, R. D., Orsulak, P. J.** (1984). Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Anal. Biochem.* 138, 86-94.
- Tabor, H.** (1951). Diamine oxidase. *J. Biol. Chem.* 188, 15-36.
- Takeda, Y., Samejima, K., Nagano, K., Watanabe, M., Sugeta, H., Kyogoku, Y.** (1983). Determination of protonation sites in thermospermine and in some other polyamines by ¹⁵N and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 130, 383-389.
- Tanizawa, K., Matsuzaki, R., Shimizu, E., Yorifuji, T., Fukui, T.** (1994). Cloning and sequencing of phenylethylamine oxidase from *Arthrobacter globiformis* and implication of Tyr-382 as the precursor to its covalently bound quinone cofactor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199, 1096-1102.
- Tholl, D., Ober, D., Martin, W., Kellermann, J., Hartmann, T.** (1996). Purification, molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of homospermidine synthase from *Rhodospseudomonas viridis*. *Eur. J. Biochem.* 240, 373-379.
- Tiburcio, A. F., Altabella, T., Borrell, A., Masgrau, C.** (1997). Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* 100, 664-674.
- Tipping, A. J., McPherson, M. J.** (1995). Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 16939-16946.
- Toppel, G., Witte, L., Hartmann, T.** (1988). N-Oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochem.* 27, 3757-3760.
- Toppel, G., Witte, L., Riebesehl, B., Borstel, K. V., Hartmann, T.** (1987). Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* Species. *Plant Cell Rep.* 6 (6), 466-469.
- Torrigiani, P., Serafini, F. D., Fara, A.** (1989). Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.* 89, 69-73.
- Turowski, P. N., McGuirl, M. A., Dooley, D. M.** (1993). Intramolecular electron transfer rate between active-site copper and topa quinone in pea seedling amine oxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 17680-17682.
- von Heijne, G.** (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.
- Vonrhein, C., Schmidt, U., Ziegler, G. A., Schweiger, S., Hanukoglu, I., Schulz, G. E.** (1999). Chaperone-assisted expression of authentic bovine adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 443, 167-169.
- Walsh, C. T.** (1984). Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 493-535.
- Walters, D. R.** (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochem.* 64, 97-107.
- Walton, N. J., McLauchlan, W. R.** (1990). Diamine oxidation and alkaloid production in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochem.* 29, 1455-1456.

- Wilce, M. C., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Matsunami, H., McIntire, W. S., Ruggiero, C. E., Tanizawa, K., Yamaguchi, H.** (1997). Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* in the holo and apo forms: implications for the biogenesis of topaquinone. *Biochem.* 36, 16116-16133.
- Wilmot, C. M., Hajdu, J., McPherson, M. J., Knowles, P. F., Phillips, S. E.** (1999). Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis. *Science* 286, 1724-1728.
- Winter, C. K., Segall, H. J.** (1989). *Metabolism of pyrrolizidine alkaloids.* (Boca Raton: CRS Press).
- Zhang, X., Fuller, J. H., McIntire, W. S.** (1993). Cloning, sequencing, expression, and regulation of the structural gene for the copper/topa quinone-containing methylamine oxidase from *Arthrobacter* strain P1, a gram-positive facultative methylotroph. *J. Bacteriol.* 175, 5617-5627.
- Zhou, J. J., Zhang, G. A., Huang, W., Birkett, M. A., Field, L. M., Pickett, J. A., Pelosi, P.** (2004). Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Lett.* 558, 23-26.